Aus der Abteilung Innere Medizin IV
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Eggstein
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Elektrophoretische und kinetische Eigenschaften von Makro-Kreatinkinase im Vergleich zu Kreatinkinase-Isoenzymen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Joachim Krais
aus Tübingen

1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543903_0085

Aus der Abteilung Innere Medizin IV
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Eggstein
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Elektrophoretische und kinetische Eigenschaften von Makro-Kreatinkinase im Vergleich zu Kreatinkinase-Isoenzymen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Joachim Krais
aus Tübingen

1983

Dekan:	Professor Dr. W. Frommhold
1. Berichterstatter:	Professor Dr. M. Eggstein
2. Berichterstatter:	Professor Dr. R. Harzmann

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

REFO-DRUCK HANS VOGLER TÜBINGEN

Die vorliegende Arbeit enthält einen Teil der Ergebnisse von den Untersuchungen, die am Institut für Klinische Chemie an der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen durchgeführt wurden.

Die zum Forschungskomplex gehörenden Ergebnisse über die Spaltung CK - bindender Immunglobuline, über die Kopplung bzw. das Sättigungsverhalten isolierter Antikörper und die Verdrängung komplexgebundener Isoenzyme sowie die Charakterisierung der Makro - CK - Bindung sind in der in Vorbereitung befindlichen Promotion M. Müller beschrieben.

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	8
2.	METHODISCHES	
2.1.	UNTERSUCHUNGSMATERIAL	13
2.2.	GERÄTE	14
2.3.	VERWENDETE PUFFERLÖSUNGEN	16
2.4.	PRÄPARATION DER CK - ISOENZYME	17
2.4.1.	CK - MM	18
2.4.2.	CK - MB	18
2.4.3.	CK - BB	19
2.4.4.	radioaktive CK - BB ^{x}	19
2.4.5.	Autoradiographie	20
2.5.	DARSTELLUNG CK - BINDENDER IG G AUS PATIENTENSEREN	21
2.5.1.	Trennung durch Protein - A - Säule	21
2.5.2.	Darstellung der Ig G - Immunglobuline mittels Ausschlusschromatographie	21
2.6.	AUFSPALTUNG DER IG G - IMMUNGLOBULINE IN $F(ab')_2$ ODER Fc - UNTEREINHEITEN	22
2.6.1.	Pepsinspaltung zur Gewinnung von $F(ab')_2$-Untereinheiten	22
2.6.2.	Gewinnung von Fc - Fragmenten durch Papainspaltung	22

		Seite
2.7.	ELEKTROPHORESEN	23
2.7.1.	CK - Isoenzym - Elektrophorese in Agarosegel	23
2.7.2.	Elektrophoresen auf Celluloseacetatfolie	24
2.7.3.	Isoelektrische Focussierung	25
2.8.	MESSUNG DER CK - AKTIVITÄT	27
2.8.1.	Gesamt - CK - Bestimmung	27
2.8.2.	CK - MB - Bestimmung	28
2.9.	ENZYMKINETIK, MICHAELIS - KONSTANTE	29
3.	ERGEBNISSE	
3.1.	GEWINNUNG DER CK - ISOENZYME	30
3.1.1.	CK - MM	30
3.1.2.	CK - MB	32
3.1.3.	CK - BB	35
3.2.	ELEKTROPHORETISCHE TRENNUNG DER CK - ISOENZYME	38
3.2.1.	Cellulose - Acetatfolien - Elektrophorese	38
3.2.2.	Agarosegel - Elektrophorese	39
3.3.	ELEKTROPHORETISCHE MOBILITÄT IMMUNGLOBULINGEBUNDENER CK	40
3.4.	BEEINFLUSSUNG DER KINETISCHEN PARAMETER IG - G - GEBUNDENER CK - ISOENZYME	42

Seite

3.4.1. Abhängigkeit der katalytischen Aktivität von der Ig G - Konzentration 43

3.4.2. Bestimmung von maximaler Reaktionsgeschwindigkeit und Michaelis - Konstante 45

3.5. KINETISCHE PARAMETER NATIVER MAKRO - CK SEREN 54

3.6. BESTIMMUNG DES ISOELEKTRISCHEN PUNKTES 58

3.6.1. IP der CK - MM 58

3.6.2. IP der CK - MB 60

3.6.3. IP der CK - BB 62

3.6.4. IP der Makro - CK 64

4. DISKUSSION

4.1. ISOLIERUNG DER CK - ISOENZYME AUS MENSCHLICHEM GEWEBE 69

4.2. BEEINFLUSSUNG DER KINETISCHEN PARAMETER IG - G - GEBUNDENER CK - ISOENZYME 72

4.3. BESTIMMUNG DES IP VON CK - ISOENZYMEN UND MAKRO - CK - KOMPLEXEN 74

4.3.1. IP der CK - MM 75

4.3.2. IP der CK - MB 76

4.3.3. IP der CK - BB 76

4.3.4. IP der Makro - CK - Formen 77

5. ZUSAMMENFASSUNG 79

6. LITERATURVERZEICHNIS 81

7. LEBENSLAUF 91

1. EINLEITUNG

Die Kreatin - Kinase (ATP: Kreatin - Phosphotransferase E. C. 2.7.3.2., Abkürzung: CK) stellt ein Schlüsselenzym für die Versorgung des Zellstoffwechsels mit energiereichen Phosphaten dar.
Das hauptsächlich im Zytoplasma lokalisierte Enzym transferiert durch Übertragung einer Phosphat - Gruppe Energie aus einer Säureamid - Bindung (Kreatin - Phosphat) in eine ebenfalls energiereiche Säureanhydrid - Bindung des Adenosintriphosphat (ATP).

Kreatin - P + ADP $\rightleftharpoons$ Kreatin + ATP

$\Delta G^{\circ\prime} = -3{,}0$ kcal mol^{-1} (LENINGER, 1975)

$\Delta G^{\circ\prime}$ = Änderung der freien Enthalpie unter Standardbedingungen (25°C, pH 7,0 , einmolare Konzentrationen der Reaktionsprodukte)

Der negative Wert von $\Delta G^{\circ\prime}$ zeigt, dass das Gleichgewicht nach rechts ausgerichtet ist. Das Enzym gehört somit neben der Adenylat - Kinase zum ATP - regenerierenden System.
Die Bedeutung der Kreatin - Kinase liegt in der Möglichkeit der Zelle, einen Pool an energiereichen Verbindungen anzulegen, der direkt mit dem Primärenergieträger ATP im Gleichgewicht steht und deshalb sofort und ohne Sauerstoffverbrauch verfügbar ist. Hierdurch kann die Zelle im Bedarfsfall das Intervall bis zum Anlaufen der allosterisch geregelten

ATP - erzeugenden Stoffwechselwege, wie Glykolyse und Atmungsketten - Phosphorylierung, überbrücken.
ATP selbst kann nicht angereichert werden, da aus Gründen der Homöostase der "energy - charge" (LENINGER, 1975) einer Zelle und damit die ATP - Konzentration relativ konstant gehalten wird.
Die Kreatin - Kinase kommt im menschlichen Organismus in Form von 3 Isoenzymen, der CK - MM (Skelett- und Herzmuskel), CK - MB (Herzmuskel), sowie CK - BB (Gehirn und glatte Muskulatur) vor (LANG et al., 1978), wobei bei identischem Molekulargewicht verschiedene Michaelis - Konstanten beschrieben wurden (MORIN, 1976). Die Quartärstruktur des Enzyms besteht aus 2 Untereinheiten (M - oder B - Kette), die ein gemeinsames Molekulargewicht von 80.000 D ergeben (DAWSON et al.,1967).
Im Gegensatz zu diesen im Zytoplasma vorhandenen Enzymen beschrieben BLUM et al. (1978, a + b) sowie JAMES et al. (1979) eine mitochondriale CK mit identischem Molekulargewicht.
Die CK - Isoenzymverteilung im menschlichen Gewebe variiert; im Skelettmuskel findet sich bis zu 96% CK - MM, während im Myokard 72% CK - MM und 25% CK - MB, im Uterus 15% CK - MM, 24% CK - MB und 61% CK - BB der Gesamt - CK - Aktivität vorhanden sein sollen (JOCKERS - WRETOU et al., 1975).
Die organspezifische Verteilung der CK - Isoenzyme lässt bei erhöhter Serumaktivität den Schluss auf das geschädigte Organ zu (GERHARDT et al., 1977; HAUX et al., 1979), und wird heute z.B. routinemässig in der Herzinfarktdiagnostik eingesetzt.

CK - BB ist nur von seltenen Ausnahmen abgesehen im Serum nachweisbar und hat daher derzeit keine Bedeutung für die Diagnostik.

Die Serumnormalwerte für die Gesamt - CK (optimierte Standardmethode) betragen bis zu 70 U/l, für die CK - MB im Immuninhibitionstest weniger als 10 U/l, für die CK - BB etwa 0,5 U/l (JUNG et al., 1979).

Die unterschiedliche elektrische Ladung der 3 Isoenzyme bewirkt differente Mobilitäten in der Elektrophorese, die zur Identifizierung benutzt werden. CK - MM wandert bei pH 7 zur Kathode, CK - MB und stärker noch CK - BB in Richtung der Anode.

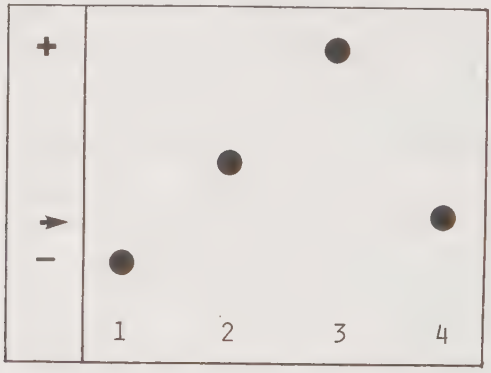


Abb.1 Elektrophoretisches Verteilungsmuster von CK - Isoenzymen und Makro - CK.

1 CK - MM
2 CK - MB
3 CK - BB
4 Makro - CK
➔ Auftragsstelle (Bezeichnung gilt auch für die folgenden Abbildungen)

Unter diesen Trennungsbedingungen weist die Kreatin - Kinase aus Kaninchengewebe eine identische elektrophoretische Mobilität auf und kann somit als Standard (Sigma, München) dienen.
In der Diagnostik fielen nach Einführung des Immuninhibitionstests gehäuft Patienten mit einer erhöhten Serum - "CK - MB" auf; diese CK - Aktivitäten persistierten über längere Zeit (LANG et al., 1978; LJUNGDAHL et al., 1978).
Auffällig war zudem das Fehlen eines direkten klinischen Korrelats (CHEMNITZ et al., 1979), weshalb das Phänomen zunächst als "idiopathische Serum - CK - BB" (LANG et al., 1978) bezeichnet wurde.
Unabhängig davon wurden bereits früher atypische CK - Banden in der Elektrophorese beschrieben (LIM, 1975; SAX et al., 1976). Diese atypischen Banden wiesen eine geringe elektrophoretische Mobilität auf und lagen zwischen CK - MM und CK - MB. Dabei wurde dieser CK - Aktivität ein Molekulargewicht von 350000 bzw. 650000 D*(BOHNER et al., 1979) zugeschrieben.
Weitergehende Untersuchungen von URDAL et al. (1979), BOHNER et al. (1979) und STEIN (1979, a + b) wiesen einen Komplex aus Ig G und CK - BB nach, der als Makro - CK bezeichnet wurde.
Ergänzend dazu beschrieb JOCKERS - WRETOU et al. (1979) einen Komplex aus Ig A mit CK - BB. Die Makro - CK zeigte ingesamt eine hohe Stabilität(STEIN et al., 1979, b).
Die in der Literatur angegebenen Häufigkeiten für die "idiopathische CK" bzw. Makro - CK reichen von 5 auf 310 (URDAL et al., 1979), 8 auf 800 (LJUNGDAHL et al., 1978), 1 auf 1000

---

*Abkürzung D: Dalton

(LANG et al., 1978) bis 6 auf 2000 (CHEMNITZ et al., 1979). Die etwas unterschiedlichen Angaben dürften wohl durch das jeweilige Selektionsprinzip bedingt sein.

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es, CK - Isoenzyme und einige Makro - Kreatinkinasen zu isolieren, sowie spezifisch nachzuweisen. Ausserdem sollten enzymkinetische Parameter ungebundener CK der von Makro - CK gegenübergestellt werden, um zu klären, ob sich durch die Makro - CK - Komplexbildung die katalytische Aktivität ändert.

2. METHODISCHES

2.1. UNTERSUCHUNGSMATERIAL

a) Humangewebe zur Isoenzymisolierung - wurde in physiologischer Kochsalzlösung bei -20°C aufbewahrt.
   - CK - MM: Operationsmaterial Skelettmuskel
   - CK - MB: Autopsiematerial Myokard (max. 36 h alt)
   - CK - BB: Operationsmaterial Uterus

b) Humanseren mit Makro - CK - Komplexen*)

c) Humanserum zur Kontrolle

*) Pat.DOE. ♀ geb. 1920, 1978 Verdacht auf akuten Myokardinfarkt, CK 204, "CK - MB" 135

Pat.RUD: ♀ geb. 1907, 1978 Papillitis stenosans, kompletter Rechtsschenkelblock, CK 438, "CK - MB" 521

Pat.NAU. Patientendaten standen uns nicht zur Verfügung

2.2. GERÄTE

Säulen: Sephadex - G - 200, 80 x 2,5 cm, Pharmacia; Uppsala
Sephadex - G - 100/200/300 sf, 59 x 0,9 cm, Pharmacia
DEAE - Sephadex - A - 50, 18 x 2,5 cm, Pharmacia
Protein - A - Sepharose Cl - 4B, 4 x 0,9 cm, Pharmacia

Pumpe: LKB 2120 Varioperex ^{R} II Pump

Durchflussphotometer: Zur Bestimmung der UV - Absorption bei 254 nm (LKB Uvicord Type 470 1 A)

Schreiber: LKB 2210 Ein - Channel Recorder

Fraktionssammler: LKB 2112 Redi Rac Fraction Collector

Elektrophoresekammer: LKB Multiphor 2117 mit LKB Power Supply 21

Glasplatten: LKB 94 x 84 x 1 mm. Nr. 2117 - 402

Filterpapier: Whatman, 253 x 104 mm, Grade I, Nr. 2117 - 203

Eppendorf Photometer Typ M 1101 mit Wechselautomatik und Schreiber

Amicon - Konzentrator Witten, Ruhr
- Mikro - Ultrafiltrationssystem Modell 8 Mc mit Diaflo-Membran, Durchmesser 25 mm, 4cm², Konzentration unter Stickstoffatmosphäre
- Minicon - Einwegkonzentrationen

Typ	Konz. - Frakt.	MG - Grenze
A 25	x 2	25000
A 75	x 20	75000
B 15	x 100	15000
B 125	x 100	125000

Impulszähler: Frieseke und Hoepfner, Erlangen mit Bohrloch-messonde J^{125}

Homogenisator Potter: "30 ml" Fa. B. Braun

Rotationsmesser: IL, X - 1020, Fa. Intern. Laborat. App., max 25000 Upm.

Sorvall RC 2 Kühlzentrifuge, Du Pont

2.3. VERWENDETE PUFFERLÖSUNGEN

Puffer I	pH 7	50 mmol/l	Tris
		20 mmol/l	NAC
		20 mmol/l	NaCl
		10 mmol/l	$MgCl_2$
		2 mmol/l	EDTA
		3 mmol/l	NaN_3
Puffer II	pH 8	50 mmol/l	Tris
		100 mmol/l	NaCl
		3 mmol/l	NaN_3
Puffer III	pH 8	50 mmol/l	Tris
		200 mmol/l	NaCl
		3 mmol/l	NaN_3
Puffer IV	pH 7	50 mmol/l	Tris
		500 mmol/l	NaCl
		3 mmol/l	NaN_3
Puffer V	pH 3	50 mmol/l	Glyzin
		20 mmol/l	NaCl
		3 mmol/l	NaN_3
Puffer VI	pH 7	300 mmol/l	Saccharose in Puffer I

2.4. PRÄPARATION DER CK - ISOENZYME

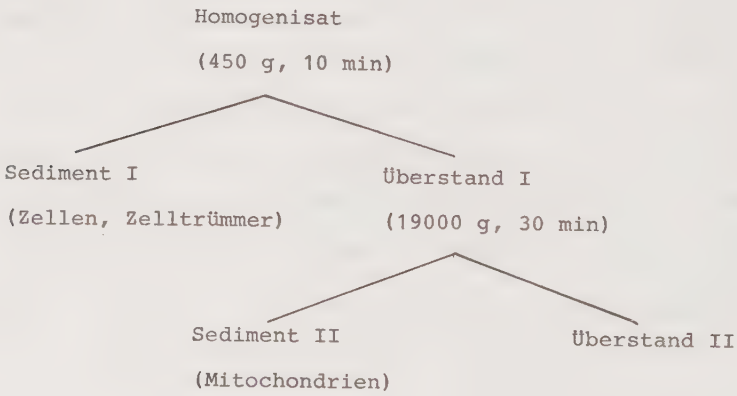
Die Gewebepartien wurden zerstückelt, in dem 10 - fachen Volumen Puffer VI und Mercaptoäthanol (Endkonzentration 40 mmol/l) suspendiert und mit einem Rotationsmesser im Eisbad weiter zerkleinert. Der Feinaufschluss erfolgte durch einen Teflon - Stempel - Homogenisator im Eisbad. Die Präparation wurde 40 min bei 25 - 30000 g zentrifugiert. Die Ausschlusschromatographie (Sephadex G - 200, 80 x 2,5 cm) des auf 3 ml eingeengten Überstandes (Amicon B 15) erfolgte pumpengesteuert bei 8°C in Puffer I, wobei kontinuierlich die Eiweisskonzentration mittels eines UV - Photometers (bei 254 nm) mit angeschlossenem Schreiber gemessen wurde. Ein Fraktionskollektor sammelte das Eluat in 6,5 ml - Fraktionen. Für die manuelle, photometrische CK - Enzymbestimmung (334 nm) wurde der NAC - aktivierte CK - UV - Test eingesetzt. Die getrennten Isoenzyme wurden eingeengt, mit Albumin (Du Pont, 4 g /dl) versetzt und eingefroren, oder bei 8°C gelagert. Als SH-Gruppenschutz wurde Mercaptoäthanol bis zu einer Endkonzentration von 40 mmol/l hinzugegeben. Die Reinheitsprüfung der Isoenzyme erfolgte jeweils mittels Agarosegel - Elektrophorese.

2.4.1. CK - MM

Die CK - MM wurde von der ebenfalls im Skelettmuskel vorkommenden CK - MB durch Ionenaustausch - Chromatographie (DEAE - SEPHADEX - A - 50, 18 x 2,5 cm) über einen linearen NaCl -gradienten (0 mmol/l bis 500 mmol/l NaCl, 50 mmol/l Tris - HCl, pH 7) getrennt.

2.4.2. CK - MB

Der Aufschluss des Autopsiematerials erfolgte wie oben beschrieben. Das Homogenisat wurde fraktioniert zentrifugiert.



Der Überstand II wurde auf eine DEAE - Sephadex - A - 50 Säule aufgetragen, die zuvor mit Puffer II äquilibriert worden war. Zur Entfernung von CK - MM spülte man die Säule mit dem 4 - fachen Bettvolumen (Puffer II); die Eluation von CK - MB erfolgte nach der MERCER - Technik im Stufengradienten (MERCER, D.W., 1974), mit Puffer III in 6 ml - Fraktionen oder durch einen linearen NaCl - gradienten (50 mmol/l bis 750 mmol/l NaCl, 50 mmol/l Tris - HCl, pH 7).

2.4.3. CK - BB

Die Gewebepräparation erfolgte wie oben beschrieben. Nach Zentrifugation (19000 g) und anschliessender Ausschlusschromatographie (Sephadex - G - 200, 80 x 2,5 cm, Puffer I), erfolgte die Eluation von CK - BB ebenfalls nach der MERCER - Technik durch einen linearen Gradienten (50 mmol/l bis 750 mmol/l NaCl, 50 mmol/l Tris - HCl, pH 7).

2.4.4. Radioaktive CK - BB^x

Zum empfindlicheren Nachweis von CK - BB in der isoelektrischen Focussierung und bei Bindungsversuchen wurde ^{125}I markierte

CK - BB (DRG, Marburg) benützt. Um eine albuminfreie, markierte CK - BB zu erhalten, wurden 5 ml Tracer aus dem RIA - KIT zum Erreichen einer NaCl - Konzentration von 200 mmol/l mit 0,7 ml Puffer IV versetzt und auf eine Roche DEAE - A - 50 Säule aufgetragen. Das markierte Albumin wusch man mit 20 ml Puffer III aus. Die markierte CK - BB löste sich unter Puffer IV vom Ionenaustauscher und wurde in 1 ml - Fraktionen gesammelt. Nach anschliessender Impulszählung vereinigte man die Fraktionen mit der höchsten Aktivität und lagerte sie nach Einengung bei 8°C.

2.4.5. Autoradiographie

Getrocknete Agarosegelplatten bzw. in Folie eingeschweisste PAG - plates wurden in einer Röntgenfilmkassette zwischen zwei Röntgenfilmen (Du Pont) fixiert und je nach Aktivität 5 bis 14 Tage exponiert.

2.5. DARSTELLUNG CK - BINDENDER IG G AUS PATIENTENSERUM

(Vergleiche unveröffentlichte Promotion Michael Müller)

2.5.1. Trennung durch die Protein - A - Säule

Die nach der Spaltung von Humanseren auf der Protein - A - Sepharose - Cl - 4B - Säule zurückgehaltenen Ig G - Globuline wurden mit Puffer V eluiert, neutralisiert und eingeengt.

2.5.2. Darstellung der Ig G - Immunglobuline mittels Ausschlusschromatographie

Makro - CK - haltige Seren wurden zur Spaltung des Immunglobulin - CK - Komplexes angesäuert (pH 3,2). Nach 30 min wurde eine Ausschlusschromatographie (Sephadex - G - 200, Glyzin - Puffer, pH 3,4) durchgeführt; das Eluat wurde neutralisiert und eingeengt.

2.6. AUFSPALTUNG DER IG G - IMMUNGLOBULINE IN F $(ab')_2$ - ODER F_c - UNTEREINHEITEN

(Vergleiche unveröffentliche Promotion Michael Müller)

2.6.1. Pepsinspaltung zur Gewinnung von $F(ab')_2$ - Untereinheiten

Humanes Makro - CK - Serum sowie separiertes Ig G wurden mit 4 mg Pepsin (Merck, Darmstadt, E.C.3.4.23.1) versetzt (pH 3, 37°C) und 48 h inkubiert. Der Ansatz wurde auf eine Protein - A - Säule aufgetragen; die $F(ab')_2$ - Fragmente wurden mit Puffer I eluiert.

2.6.2. Gewinnung von Fc - Fragmenten durch Papainspaltung

4 ml einer Ig G - haltigen Lösung (Protein - A - Säule) wurden mit 1,2 mg Papain (Merck, Darmstadt, E.C.3.4.22.2) 6 h inkubiert (pH 8, 37°C). Retinierte ungespaltene Ig G - und Fc - Fragmente wurden mit Puffer V von der Protein - A - Säule eluiert und anschliessend durch eine Ausschlusschromatographie getrennt.

2.7. ELEKTROPHORESEN

2.7.1. CK - Isoenzym - Elektrophorese in Agarosegel

Die industriell gefertigten Agarosegelplatten zeigten in unseren Versuchen eine zu geringe Sensitivität. Deshalb wurden selbst gegossene Platten benutzt.
Agarose L (Behringwerke Marburg) wurde in einer Konzentration von 1,5 g/dl mit Puffer I versetzt, aufgekocht und in heissem Zustand auf entfettete Glasplatten (LKB, 9,4 x 8,3 x 0,1 cm) gegossen, so dass ein gleichmässiges Gel von 1,5 mm entstand. Die Agarosegelplatten wurden 1 h mit Äquilibrierungslösung (Sigma) überschichtet, danach abgefliesst (LKB Elektrodenpapier). Kleine,zinnenartig geschnittene Kartonstreifen, etwa 1/3 der Gelbreite von der Kathode entfernt,senkrecht auf die Gelplatte gestellt, verursachten durch Saugwirkung kleine Auftragsrillen, sodass die Auftragsmenge je Startposition bis zu 20 µl betrug. Die jeweiligen Seren wurden mit einer Hamilton - Mikropipette (Hamilton Bonaduz, Schweiz , 10 µl) aufgebracht.
Als Standard diente ein CK - Isoenzymgemisch vom Kaninchen (CPK - Isotrol, Sigma). Die Elektrophorese wurde in einer Multiphor - Kammer (LKB) mit dazugehörigem Stromversorgungsteil (LKB Power Supply) und Bis - Tris - Acetat Puffer (100 mmol/l, pH 6,9) bei einer Spannung von 4 - 5 Volt/cm 2 bis 2,5 h durchgeführt. Die Spannungskontrolle erfolgte durch direkten Spannungsabgriff im Gel. Ein Kryostat kühlte die Kammer auf 8°C. Nach Abschluss der Elektrophorese schloss sich eine spezifische

CK - Färbung an (Sigma, CPK, Agaro - Stain). Dabei bildete sich Tetrazoliumblau - Formazan an den Stellen, wo eine enzymatische Umsetzung stattgefunden hatte.
Je nach Enzymaktivität der Probe wurde die Färbung nach 15 - 20 min bei 37°C im Wärmeschrank durch Zugabe einer Stopplösung (70 ml Methanol, 25 ml H_2O, 5 ml Eisessig) beendet. Nach 30 - 60 min und nachfolgendem mehrmaligem Wässern in Aqua dest. wurden die Gelplatten unter einem Föhn getrocknet. In diesem Zustand und unter Lichtabschluss waren die Platten haltbar.

2.7.2. Elektrophoresen auf Celluloseacetatfolie

Die Serumelektrophorese erfolgte auf Celluloseacetatfolien (57 x 145 mm, Boskamp) in einer Elektrophoresekammer (Mikrophor Boskamp) mit Stromversorgungsteil und einem Elektrophorese - Puffer (Michaelispuffer, pH 8,6) innerhalb 30 min bei einer angelegten Spannung von 250 Volt und einer Stromstärke von 10 mA. Mit einem Auftragsstempel (1 µl) wurden die Seren auf die eingespannte Folie gebracht. Eine Rasterbrücke als Hilfsvorrichtung gewährleistete eine saubere Auftragstechnik. Die Proteinfärbung erfolgte mit Amidoschwarz.

Färbung : 4 - 5 min in gesättigter Amidoschwarz - B - Lösung in Methanol - Eisessig (9:1)

Mehrmaliges Differenzieren der Folien durch Entfärbelösung (Methanol - Eisessig).

Nach dem Entfärben wurden die Celluloseacetatfolien bei 70°C auf einer Glasplatte fixiert. Die Auswertung der Proteinbanden erfolgte durch ein Densitometer (Zeiss KFE 4).

Spezifische CK - Färbung (Sigma; CPK, Agaro - Stain).

2.7.3. Isoelektrische Focussierung

2.7.3.1. Durchführung in verschiedenen pH - Bereichen

Polyacrylamidgel - Fertigplatten (LKB - Ampholine PAG - Plates, pH 5,5 bis 8,5 und 3,5 bis 9,5) wurden zur Elektrofocussierung eingesetzt.

Die PAG - Plate wurde luftblasenfrei (Kontaktflüssigkeit: hochsiedender Petroläther oder Toluol) auf die durch einen Kryostaten auf 5 bis 8 °C gehaltene Kühlplatte gelegt; die Seren mittels kleiner Probeaufgabepapierchen (Auftragsvolumen etwa 15 µl) aufgetragen. Nach Auflegen der mit den entsprechenden Lösungen getränkten Elektrodenstreifen konnte die Spannung angelegt werden. 30 bis 60 min später unterbrach man die Elektrophorese kurz, um die Probeaufgabepapierchen zu entfernen; die Elektrofocussierung wurde, nachdem sich der Gradient aufgebaut hatte, 2 h durchgeführt. Bei Abschluss der Focussierung erfolgte eine Kontrolle des pH - Gradienten durch ein direkt

auf das Gel aufgelegtes pH - Papier (Merck, Universalindikatorpapier, pH 1 bis 10). Die PAG - Plates wurden 20 min auf CK - Aktivität angefärbt (Sigma). Zur Dokumentation trocknete man die Polyacrylamidgele bei 60 °C an, schweisste sie in Klarsichtfolie ein und bewahrte sie unter Lichtabschluss auf.

	pH 3,5 - 9,5	pH 5,5 - 8,5
Anodenlösung	1 mol/l H_3PO_4	0,4 mol/l N_2 - Hydroxyäthyl - piperazin - N_2 - äthan - sulfonsäure
Kathodenlösung	1 mol/l NaOH	0,1 mol/l NaOH
Leistung	30 W	25 W
Spannung	1500 V	1600 V
Stromstärke	50 mA	50 mA
Dauer	1,5 h	2,5 h

Tab.1 Elektrophoresebedingungen für pH 3,5 - 9,5 und 5,5 - 8,5

2.7.3.2. Identifizierung der CK - Banden

Zur qualitativen Identifizierung der einzelnen CK - Aktivitätsbanden und um die Frage einer möglichen Dissoziation der CK - MB in ihre Monomere zu erfassen, belud man eine LKB - PAG - Plate (pH 3,5 - 9,5) mit hohen Enzymaktivitäten (ca. 3000 U/l) an CK - MB bzw. CK - BB. Nach Abschluss der Focussierung zerschnitt man die PAG - Plate parallel zu den Elektroden in 1 cm breite Streifen. Die Polyacrylamidgelstreifen wurden mit dem doppelten

Volumen Puffer I suspendiert und auf pH 7 eingestellt, mit Mercaptoäthanol (40 mmol/l) versetzt und anschliessend scharf abzentrifugiert (19000 g, 30 min). 20 µl des auf das 3 - fache konzentrierten Überstandes (Amicon B 15) wurden in Agarosegel elektrophoretisch getrennt und auf CK - Aktivität angefärbt.

2.8. MESSUNG DER CK - AKTIVITÄT

2.8.1. Gesamt - CK - Bestimmung

(CK - NAC - aktiviert, Böhringer, Mannheim)

Das Testprinzip beruht auf der "optimierten Standardmethode" der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie (Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie).

Reaktionsablauf:

I Kreatinphosphat + ADP $\xleftrightarrow{CK}$ Kreatinin + ATP

II Glucose + ATP $\xleftrightarrow{HK}$ Glucose - 6 - phosphat + ATP

III Glucose - 6 - phosphat + $NADP^+$ $\xleftrightarrow[DH]{G\text{-}6\text{-}p}$ Gluconat - 6 - phosphat + NADPH + H^+

Die Extinktionsmessung erfolgte am Eppendorf - Photometer bei 334 nm (25°C; für die Messung der Kinetik bei 30 °C).
Die Präzisions - und Richtigkeitskontrolle erfolgte mit Hilfe eines Standardserums mit einer definierten CK - Aktivität von 143,4 U/l ± 4,5 (n = 84) (Ortho Diagnostics, New Jersey).

Berechnung der CK - Aktivität:

$$U/l = 4207 \times \Delta E_{334\ nm}/min$$

Standardserum: 143,4 U/l ± 4,5 (n = 84)

2.8.2. CK - MB - Bestimmung

(CK - MB, NAC - aktivierter UV - Test, Merck, Darmstadt)

Der Test basiert auf dem Prinzip der Gesamt - CK - Bestimmung; zusätzlich enthält der Test Antikörper von der Ziege, die die CK - "M" - Untereinheit in ihrer Aktivität hemmen, die Aktivität der in der Probe vorhandenen CK - "B" - Untereinheit jedoch nicht beeinflussen. Die im Test vorhandenen Antikörper hemmen Seren mit Aktivitäten bis zu 1000 U/l CK - MM vollständig. Bei höheren CK - MM Aktivitäten ist eine Vorverdünnung notwendig.

Berechnung der CK - Aktivität:

$$U/l = 4369 \times \Delta E_{334\ nm}/min$$

2.9. ENZYMKINETIK, MICHAELIS - KONSTANTE

Zur Bestimmung der Michaelis - Konstanten der CK - Isoenzyme sowie der Makroformen für Kreatin - Phosphat fand der NAC - aktivierte Testkit der Firma Böhringer Verwendung.

Die manuelle K_M - Bestimmung erfolgte am Eppendorf - Photometer bei 334 nm und 30°C in 3 - facher Bestimmung , bei Kreatin - Phosphat - Konzentrationen zwischen 0,25 und 10 mmol/l (Negativwert auf der Abszisse). Die graphische Bestimmung des Km - Wertes erfolgte im doppelt - linearen Diagramm nach CORNISH - BOWDEN.

Die Kreatin - Phosphat - Konzentration ergibt den Schnittpunkt mit der Abszisse, während die gemessene CK - Aktivität im Ansatz den Schnittpunkt mit der Ordinate ergibt. Die Verbindung der beiden zusammengehörigen Werte ergibt eine Gerade.

Bei n Messungen (n Geraden) schneiden sich die Geraden in $\frac{n \cdot (n-1)}{2}$ Schnittpunkten untereinander. Der Km - Wert ergibt sich als Median der auf die X - Achse (Kreatin - Phosphat) projezierten Schnittpunkte; V_{max} lässt sich als Median der auf die Y - Achse bezogenen Schnittpunkte (V_{max}(U/l)) erhalten.

Die statistische Abschätzung der Enzymparameter erfolgte nach " non parametric estimation by rank - correlation methods" nach KENDALL (PORTER et al., 1977; KENDALL, 1970; Tabelle: HOLLANDER und WOLFE, 1973). Der Vorteil dieser Methode gegenüber der Statistik von CORNISH - BOWDEN lag in der besseren Anschaulichkeit der Konfidenzintervalle.

3. ERGEBNISSE

3.1. GEWINNUNG DER CK - ISOENZYME

Neben CK - MM (Skelettmuskel), CK - MB (Myokard) und CK - BB (Uterus) wurde auch CK - MM aus der Herzmuskulatur aufgearbeitet. Es stellte sich heraus, dass die CK - Präparationen nicht eingefroren werden konnten, da dies einen Aktivitätsverlust von 50 - 90% zur Folge gehabt hätte, der auch nach Reaktivierung mit Mercaptoäthanol (40 mmol/l) nicht vollständig reversibel gewesen wäre. Daher wurden die gereinigten Enzyme in einer Eiweissmatrix aus Albumin (4 gr/100 ml) bei 4°C aufbewahrt und innerhalb von 4 Wochen verarbeitet. Unter diesen Bedingungen zeigte sich kein wesentlicher Aktivitätsabfall.

3.1.1. CK - MM

In der vorgeschalteten Ausschlusschromatographie (Sephadex - G - 200, Säulenvolumen 393 cm^3, 6,5 ml je Fraktion) verteilte sich die CK - Aktivität in den Fraktionen 22 - 40 mit einem Maximum in den Fraktionen 31 - 37.

Der zweite Reinigungsschritt zur Isoenzymtrennung mittels Ionenaustauscher erfolgte nach MERCER et al. (1974). CK - MM erschien charakteristisch früh mit einem Maximum in der fünften bis sechsten Fraktion. Zur Prüfung der Isoenzymverteilung wurden die Präparationen elektrophoretisch untersucht.

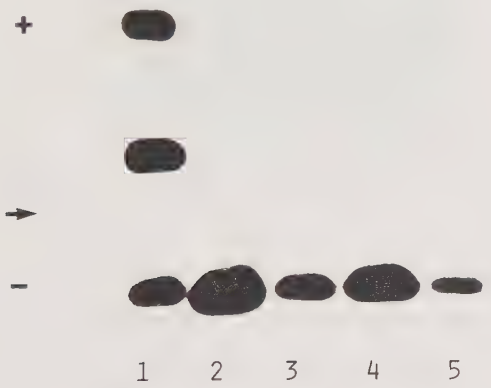


Abb.2 Elektrophoretische Kontrolle von chromatographisch gereinigter CK - MM (Ausschlusschromatographie: Sephadex - G - 200; Anionenaustauscher: DEAE - Sephadex - A - 50) Elektrophorese in Agarosegel (2 h bei 4 V/cm), Auftragsvolumen jeweils 4 µl.

1 Standard (Sigma)

2 Fraktion 31 - 37 (Ausschlusschromatographie) unverdünnt

3 Fraktion 31 - 37 (Ausschlusschromatographie) 1 : 10 verdünnt

4 Eluat (Ionenaustauscherchromatographie) unverdünnt

5 Eluat (Ionenaustauscherchromatographie) 1 : 10 verdünnt

Die CK - MB Beimengungen in der MM - Präparation betrug maximal 2% (siehe Abb.2, Spur 2). Es stellte sich heraus, dass bereits die Reinigung auf einem Anionenaustauscher eine vollständige Isoenzymtrennung bewirkte.

3.1.2. CK - MB

Die Isoenzymtrennung erfolgte chromatographisch (DEAE - Sephadex - A - 50). Unter diesen Bedingungen wurden die CK - MB und die CK - BB an Trägermaterial absorbiert, während CK - MM mit Puffer II frühzeitig mit einem scharfen Maximum nach 5 - 6 Fraktionen eluiert wurde. Bei entsprechender Ionenstärke (Puffer III) wird CK - MB selektiv vom Ionenaustauscher gedrängt. Bei den Präparationen von CK - MB variierte das Verhältnis CK - MM zu CK - MB stark. Teilweise fand sich bei noch vorhandener CK - MM keine CK - MB - Aktivität mehr. Wir führten dies auf das unterschiedliche Alter des Autopsiematerials und die damit verbundenen autolytischen Veränderungen zurück. Dies dürfte durch die im Vergleich zur CK - MM erheblich geringere Stabilität der CK - MB gegenüber Einflüssen wie Wärme und pH bedingt sein. Es wurde deshalb vor jeder Enzymisolierung die Gesamt - CK - und die CK - MB - Aktivität im Homogenisat bestimmt und die CK - MB - Präparation nur bei ausreichender Enzymaktivität durchgeführt. Allerdings täuschte der CK - MB - Immuninhibitionstest einen wesentlich höheren Gehalt an CK - MB vor als tatsächlich in der Chromatographie gefunden wurde.

Dieser Effekt war auch bei starker Verdünnung des Homogenisats noch nachweisbar.

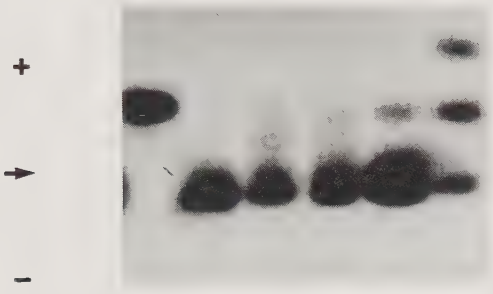


Abb.3 Elektrophoretische Kontrolle der aus Myokard isolierten CK - MB. Isoenzymtrennung durch Anionenaustauscher (DEAE - Sephadex - A - 50). Elektrophorese in Agarosegel (2 h bei 4 V/cm), Auftragsvolumen jeweils 7 µl.

1 CK - MB aus Myokard , 1 :10 verdünnt

2 CK - MM aus Myokard , 1 :10 verdünnt

3 Sediment II, 1:10 verdünnt

4 Sediment I, 1 :10 verdünnt

5 Homogenisat aus Myokard, 1 :10 verdünnt

6 Standard (Sigma)

Die aus Gründen der Zeitersparnis bei der Enzymisolierung durchgeführte CK - MB Darstellung im "Batch - Verfahren" bewährte sich nicht. Die CK - MB zeigte nach viermaligem Spülen immer noch eine CK - MM Verunreinigung von 5%.

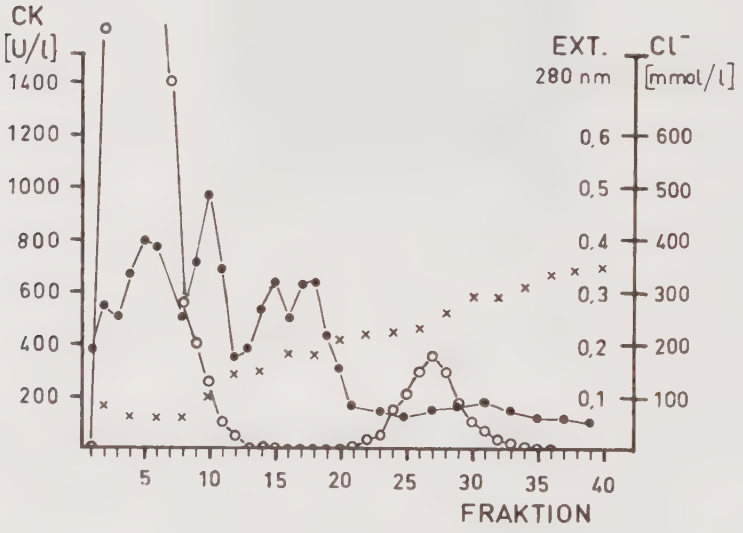


Abb.4 Anionenaustauschchromatographie von humanem Myokardhomogenisat (Überstand II) zur Isolierung der CK - MB. Die Trennung erfolgte im linearen NaCl - gradienten (50 mmol/l Tris - HCl, 50 mmol/l NaCl bis 750 mmol/l NaCl, pH 7) an einer Sephadex - DEAE - A - 50 Säule (18 x 2,5 cm, Fraktionsvolumen 6 ml, Temperatur: 6°C). CK - MB - Aktivität liess sich in den Fraktionen 22 - 32 nachweisen.

x x x Chloridkonzentration (mmol/l)

● ● ● Proteinextinktion bei 280 nm

o o o CK - Aktivität (U/l)

3.1.3. CK - BB

Die Isolierung der CK - BB erfolgte in 2 Teilschritten (vergleiche Isolierung CK - MM). Die CK - Aktivität fand sich bei der Auschlusschromatographie in den Fraktionen 22 - 44 (je 6,5 ml) mit einem Maximum in der Fraktion 34 von etwa 2500 U/l.
Bei der Enzymtrennung an Sephadex DEAE - A - 50 erschien CK - BB nach Anlegen eines linearen NaCl - gradienten bei einer Chloridkonzentration von etwa 270 mmol/l im Eluat. Die CK - BB - Aktivität verteilte sich auf die Fraktionen 45 -75 (je 6,5 ml) mit einem Maximum in der Fraktion 56 und einer Enzymaktivität von 550 U/l.
In allen Präparationen enthielt das Uterusgewebe ausschliesslich CK - BB; lediglich in einem Fall fand sich im Operationsmaterial etwas Vaginalmuskulatur und damit rund 30% CK - MM.

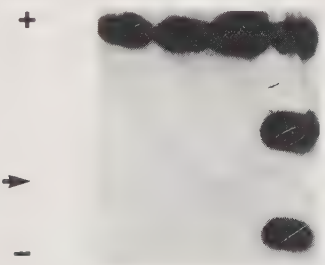


Abb.5 Kontrollelektrophorese der aus Uterusgewebe isolierten CK - BB. Reinigung durch Auschlusschromatographie

(Sephadex - G - 200) und Anionenaustauscher (Sephadex - DEAE - A - 50). Elektrophorese in Agarosegel (2 h bei 4 V/cm). Auftragsmenge: 4µl

1 CK - BB, Eluat der Anionenaustauschersäule Fraktion 58

2 CK - BB, Eluat der Anionenaustauschersäule Fraktion 48

3 CK - BB, gepooltes Eluat der Ausschlusschromatographie

4 Standard (Sigma)

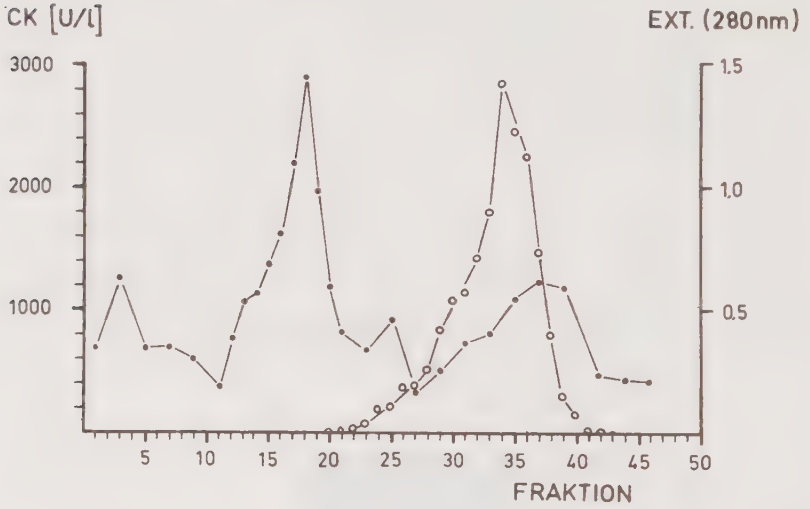


Abb.6 Molekularausschlusschromatographie des hochtourig abzentrifugierten (19000 g, 30 min) Überstandes aus menschlichem Uterushomogenisat. Sephadex - G - 200 Säule (80 x 2,5 cm, Fraktionsvolumen 6,5 ml, Temperatur 8°C), Eluationspuffer: Puffer I. CK - BB - Aktivität fand sich in Fraktion 22 - 41.

● ● ● Proteinextinktion bei 280 nm

o o o CK - Aktivität (U/l)

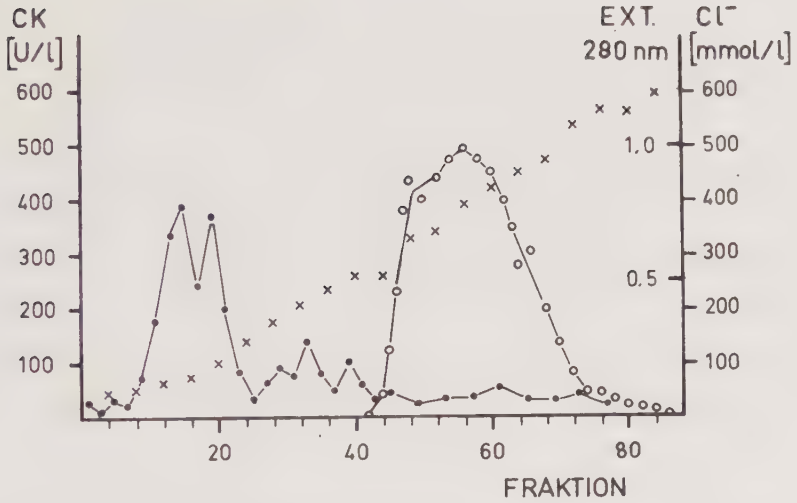


Abb.7 Anionenaustauscherchromatographie der durch eine Sephadex - G - 200 Säule vorgereinigten CK - BB Fraktion aus Uterusgewebe. Die Trennung der CK - BB erfolgte im linearen NaCl - gradienten (50 mmol/l Tris - HCl, pH 7, 50 mmol/l NaCl bis 750 mmol/l NaCl) an einer Sephadex - DEAE - A - 50 Säule (18 x 2,5 cm, Temperatur 8°C, Fraktionsvolumen 6 ml). Die CK - BB erschien ab einer Chloridkonzentration von 300 mmol/l in den Fraktionen 44 bis 80.

x x x Chloridkonzentration (mmol/l)

● ● ● Proteinextinktion bei 280 nm

o o o CK - Aktivität (U/l)

3.2. ELEKTROPHORETISCHE TRENNUNG DER CK - ISOENZYME

Um eine möglichst einfache und reproduzierbare CK - Isoenzymtrennung zu finden, wurden folgende elektrophoretische Methoden erprobt.

3.2.1. Cellulose - Acetatfolien - Elektrophorese

Diese Elektrophorese wurde aufgrund der einfachen Handhabung und hoher Trennleistung bei kurzer Trennzeit gewählt und mit verschiedenen Elektrophorese - Puffern getestet. Die Probenauftragsmenge war, bedingt durch das Trägermaterial, auf maximal 1 µl begrenzt. Dies wirkt sich nachteilig auf die Nachweisempfindlichkeit bei niedrigen Enzymaktivitäten aus.
Schwierig war auch die Anfärbung der Isoenzyme, da die Enzyme offenbar wenig auf der Trägerfolie haften und mit der Färbelösung leicht aus der Celluloseschicht gelöst werden. Versuche, die Färbung durch ein Abklatschverfahren (in Färbelösung getauchte Filterpapierstreifen wurden auf die Cellulose - Acetatfolien gelegt) zu optimieren, verbesserten wohl die Enzymdarstellung; insgesamt jedoch war die CK - Isoenzymauftrennung auf Cellulose - Acetatfolien mit den geprüften Färbemethoden (Sigma - Färbung) in bezug auf Trennschärfe und Nachweisempfindlichkeit unzureichend.

3.2.2. Agarosegel - Elektrophorese

a) Bessere Ergebnisse erbrachten Fertigagarosegelplatten (Sigma, siehe 2.7.1.). Nachteilig war auch hier die auf 1 bis 2 µl reduzierte Auftragsmenge.

b) Zufriedenstellende Resultate wurden mit frisch gegossenen Agarose - L - Gelen (siehe 2.7.1.) mit einer Schichtdicke von 1,5 mm erzielt. Durch diese Technik konnten Probevolumina bis zu 20 µl aufgetragen werden und die Nachweisgrenze für CK - Aktivitäten bis auf 15 U/l gesenkt werden. Die besten Trennergebnisse wurden bei einer angelegten Spannung von 4 - 5 V/ cm Gel und einer Trenndauer von 5,5 Stunden erzielt.

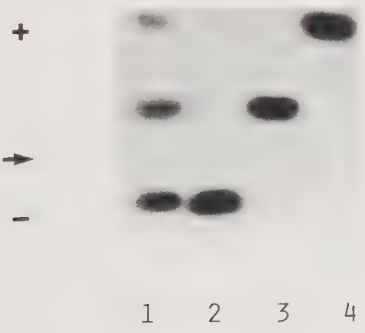


Abb.8 Darstellung der CK - Isoenzyme durch eine Elektrophorese; 5,5 h bei 4V/cm Gel, pH 7

1	Standard (Sigma)	7 µl
2	CK - MM (1100 U/l)	8 µl
3	CK - MB (1100 U/l)	8 µl
4	CK - BB (1100 U/l)	8 µl

Die CK - MM wandert bei pH 7 kathodenwärts der Auftragsstelle, CK - MB und CK - BB anodenwärts, wobei die CK - BB die höhere Mobilität aufweist. Ausserdem zeigte sich, dass der Abstand der CK - MB zur CK - BB bzw. CK - MM identisch war.
Die untersuchten Makro - Kreatinkinasen zeichnen sich dadurch aus, dass sie im Gegensatz zu den "klassischen" CK - Isoenzymen eine charakteristisch geringe elektrophoretische Mobilität besitzen und konstant zwischen CK - MM und CK - MB nachweisbar sind.

3.3. ELEKTROPHORETISCHE MOBILITÄT IMMUNGLOBULINGEBUNDENER CK

Durch spezifische, gegen das M - Monomer der CK gerichtete Antikörper von der Ziege (CK - MB - Hemmtest, Merck) wurde die Auswirkung dieser Antikörper auf die elektrophoretische Mobilität der CK - MB im Vergleich zu der humaner Immunglobulin - CK - Komplexe geprüft. Der Ansatz für die Mischung von CK - MB mit dem CK - MB - Hemmtest betrug:

20 µl CK - MB (600 U/l) + 40 µl AK (CK - MB - Hemmtest)
bei 20°C über 20 min

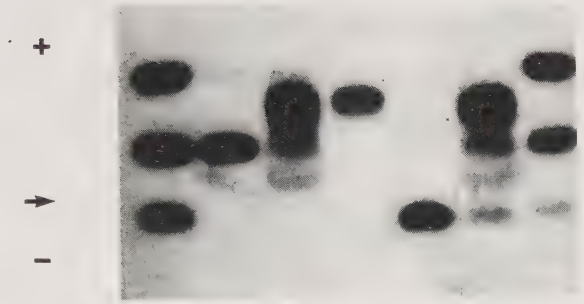


Abb. 9 CK - MB - Hemmtest im Vergleich zur Komplexbildung CK + Ig G (RUD.). Elektrophorese in Agarosegel, 2 h bei 4 V/cm

1	Standard	5 µl
2	CK - BB + AK (RUD.)	10 µl
3	CK - BB (400 U/l)	10 µl
4	CK - MB + AK (Merck)	10 µl
5	CK - MB + AK (RUD.)	10 µl
6	CK - MB (400 U/l)	8 µl
7	Standard	5 µl

Die Antikörper (RUD.) bildeten mit den CK - Isoenzymen CK - MB und CK - BB eine deutliche Makro - CK - Bande mit typisch geringer elektrophoretischer Mobilität (Abb.9), wobei die Makro - CK - BB - Bande eine Verunreinigung mit CK - MB aufwies.

Auffällig war weiter die unterschiedliche Mobilität der Makro - CK - Komplexe. Der Makro - CK - Komplex mit dem Antikörper von der Ziege ist polyklonaler Natur und hat ein erheblich höheres Molekulargewicht. Dies dürfte auch erklären, warum dieser Komplex im elektrischen Feld der Elektrophorese am Auftragsort liegen bleibt. Im Unterschied dazu zeigte der Komplex mit Ig G (RUD.), der monoklonaler Natur ist, eine geringe Mobilität.

3.4. BEEINFLUSSUNG DER KINETISCHEN PARAMETER IG G - GEBUNDENER CK - ISOENZYME

Da Makro - CK ein Komplex aus Ig G und CK ist, wurde eine mögliche Beeinflussung des aktiven Zentrums des Enzyms durch die Antikörper - Bindung geprüft. Dazu wurde die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) und die Michaelis - Konstante (K_M) bestimmt.

3.4.1. Abhängigkeit der katalytischen Aktivität von der Ig G - Konzentration

Steigende Mengen gereinigter Antikörper (Pat.RUD. , CK - frei) wurden zu einer konstanten Aktivität an CK - BB gegeben und 2 Stunden bei 4°C inkubiert.
Um den Proteingehalt in den Ansätzen konstant zu halten, wurde Albumin (Enzyme - Diluent, Du Pont) zugesetzt.

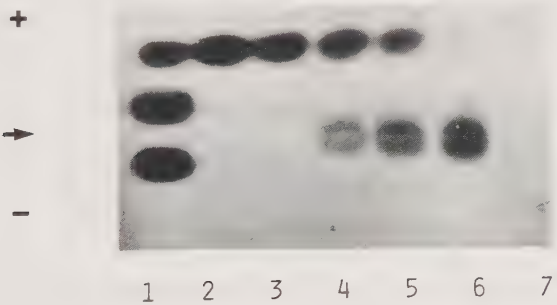


Abb. 10 Elektrophoretische Überprüfung der mit Ig G (RUD.) versetzten CK - BB. Auftragsmenge jeweils 15 µl. Die Aktivitätsmessung erfolgte durch vierfache Bestimmung bei 30°C mit der NAC - aktivierten Methode (Böhringer), 2 h bei 4 V/cm.

1 Standard (Sigma) 8 µl

2 CK - BB - Präparation

	CK - BB (µl)	Ig G RUD. (µl)	Albumin (µl)	CK - Aktivität (U/l)
3 Ansatz I	50	-	50	352
4 Ansatz II	50	15	35	374
5 Ansatz III	50	30	20	337
6 Ansatz IV	50	50	-	290
7 Ansatz V	-	50	50	0

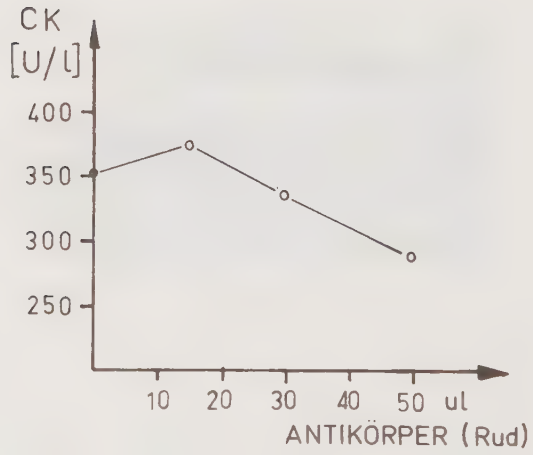


Abb. 11 Einfluss gereinigter Immunglobuline (Pat. RUD.) auf die CK - BB - Aktivität (vergleiche Abb. 10).

Abbildung 10 zeigt eine deutliche Hemmung der CK - Aktivität bei zunehmender Komplexbildung. Liegt die gesamte CK - BB in der Makro - CK - Form vor (Abb. 10, Spur 6) beträgt diese Hemmung etwa 17% der ursprünglichen Aktivität.

3.4.2. Bestimmung von maximaler Reaktionsgeschwindigkeit und Michaelis - Konstante

Die Michaelis - Konstante (K_M) und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) wurden nach dem Verfahren CORNISH - BOWDEN (1974) im "direct - linearen Plot" errechnet. Die in dreifach - Bestimmung erstellten Geraden schnitten sich in einem engen Bereich des rechten oberen Quadranten, wobei der statistisch günstigste Wert für K_M und V_{max} der Median der Schnittpunktkoordinaten mit der Abszisse bzw. der Ordinate war. Der Vorteil dieses Auswerteverfahrens besteht darin, dass die kinetischen Enzymparameter direkt aus dem Diagramm ablesbar sind und gegenüber LINEWEAVER - BURK (1934) oder EADIE - HOFSTEE - Diagrammen (1959) eine sofortige Abschätzung der Messqualität und Präzision ermöglichen. Ausreisser sind eindeutig zu identifizieren.

Sämtliche präparierten Enzyme wurden vor Versuchsbeginn elektrophoretisch geprüft. Mit der nichtparametrischen Rang - Korrelation nach KENDALL (1970) überprüften wir das Signifikanzniveau der Messgrössen K_M und V_{max} (PORTER et al., 1977).

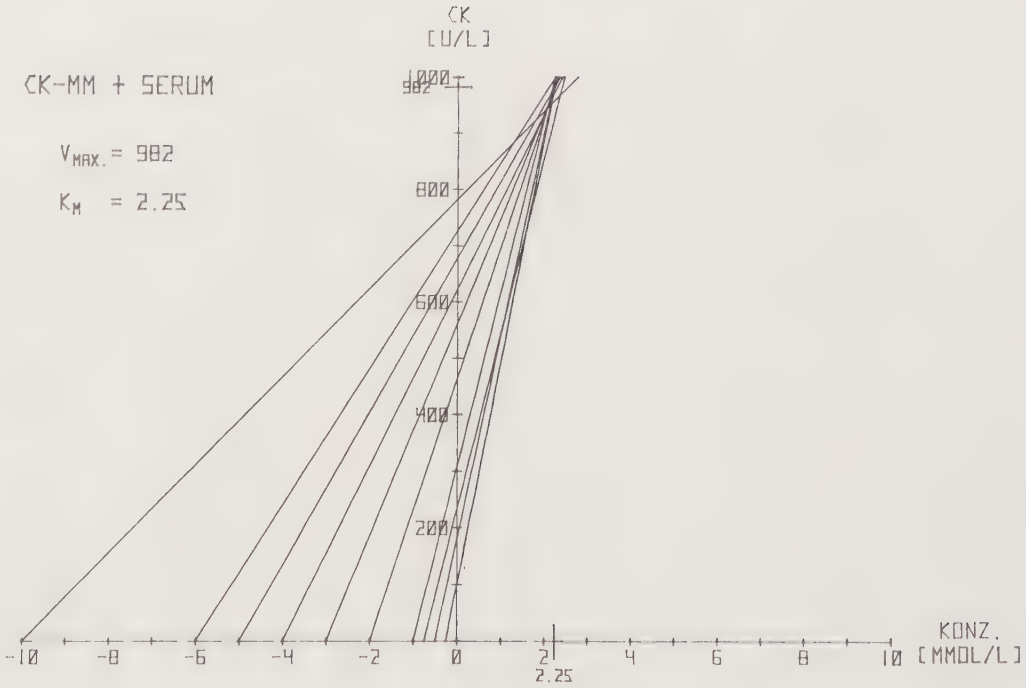


Abb. 12 K_M und V_{max} von isolierter CK - MM in Serummatrix
Auswertung nach CORNISH - BOWDEN, Bestimmung der CK - Aktivität bei 30°C, 40 mmol/l Mercaptoäthanol

3.4.2.1. Einfluss CK - bindender Antikörper auf Enzymaktivität und Substrataffinität der Isoenzyme CK - BB und CK - MB.

Zur Klärung der Natur der beobachteten Enzyminhibition wurde elektrophoretisch kontrollierte, auf 750 U/l eingestellte CK - BB mit präparierten Ig G (RUD) oder mit einer Albuminlösung (Enzymdiluent, Du Pont) versetzt. Beide Ansätze wurden auf eine Eiweisskonzentration von etwa 0,7 g/100 ml eingestellt.
Die Ansätze wurden 2 Stunden bei 8°C inkubiert:

300 µl CK - BB (750 U/l) + 450 µl Ig G - Präparation RUD

300 µl CK - BB (750 U/l) + 450 µl Rinderalbuminlösung

300 µl CK - MB (1200 U/l) + 600 µl Ig G - Präparation RUD

300 µl CK - MB (1200 U/l) + 600 µl Rinderalbuminlösung

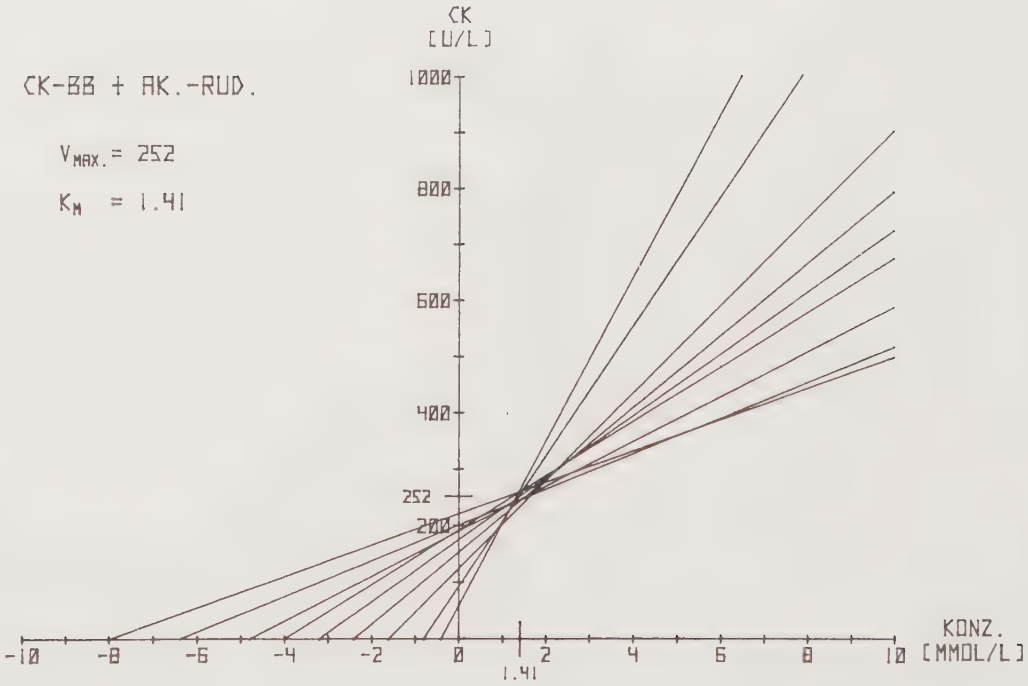


Abb.13 K_M und V_{max} von isolierter CK - BB mit Ig G - Präparation RUD. Auswertung nach CORNISH - BOWDEN, Bestimmung der CK - Aktivität bei 30°C, 40 mmol/l Mercaptoäthanol

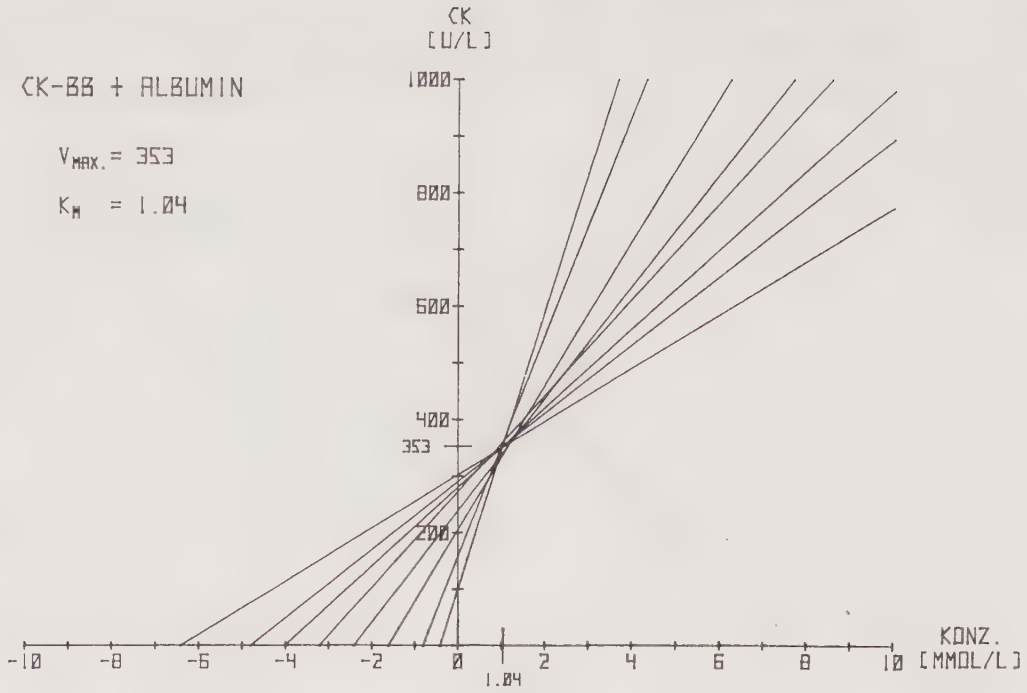


Abb. 14 K_M und V_{max} von isolierter CK - BB mit Rinderalbuminlösung. Auswertung nach CORNISH - BOWDEN, Bestimmung der CK - Aktivität bei 30°C, 40 mmol/l Mercaptoäthanol

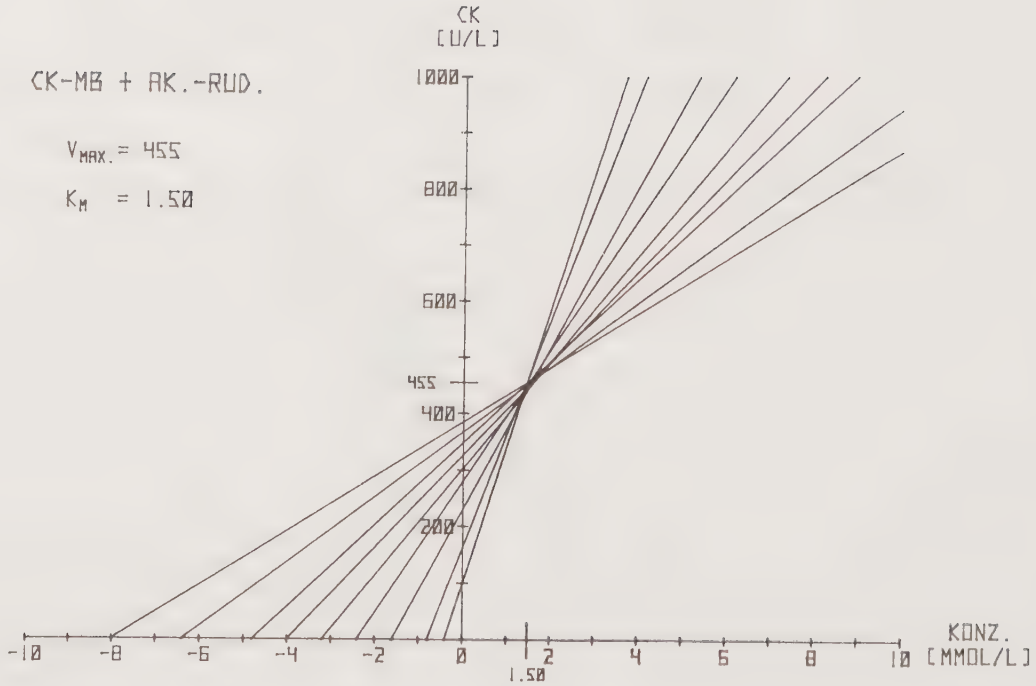


Abb. 15 K_M und V_{max} von isolierter CK - MB mit Ig G - Präparartion RUD. Auswertung nach CORNISH - BOWDEN, Bestimmung der CK - Aktivität bei 30°C, 40 mmol/l Mercaptoäthanol

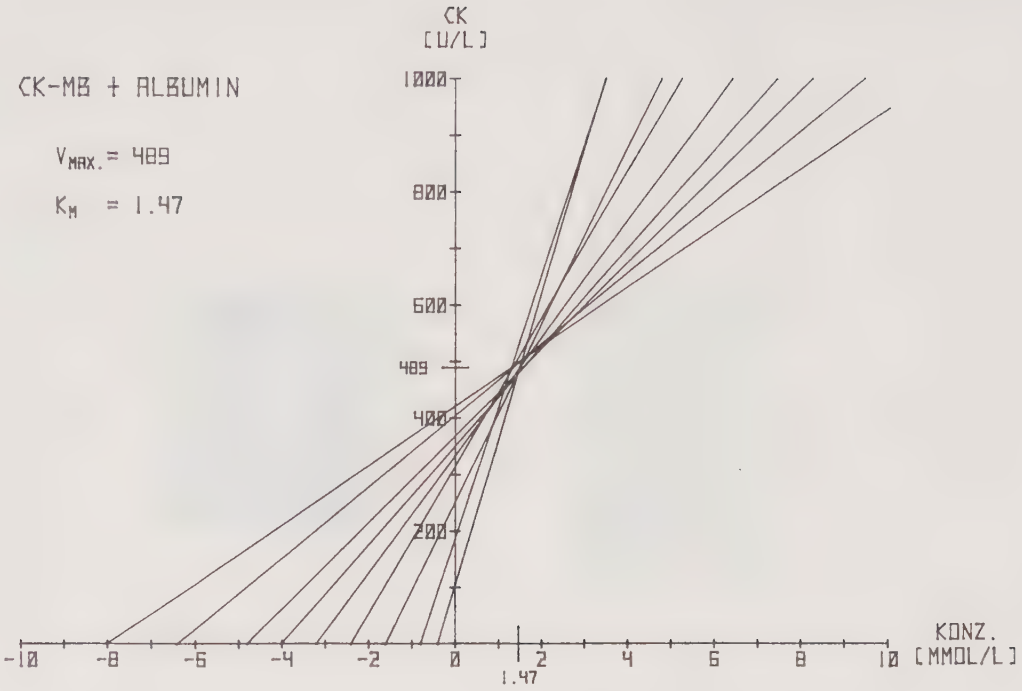


Abb. 16 K_M und V_{max} von isolierter CK - MB mit Rinderalbuminlösung. Auswertung nach CORNISH - BOWDEN, Bestimmung der CK - Aktivität bei 30°C, 40 mmol/l Mercaptoäthanol

Die kinetischen Eigenschaften von CK - BB und CK - MB verändern sich durch die Bindung an Ig G gleichsinnig: bei AK - Sättigung werden die katalytischen Aktivitäten von CK - BB um 28% und von CK - MB um 7% inhibiert. Gleichzeitig steigt der K_M - Wert der CK - BB, ebenfalls statistisch gesichert, von 1,04 mmol/l auf 1,40 mmol/l an. Durch die Bindung von CK - BB an Ig G wird offensichtlich die Affinität zum Substrat vermindert. Dieser Effekt ist für CK - MB schwächer ausgeprägt. Hier steigt der K_M - Wert nur geringfügig von 1,47 mmol/l auf 1,50 mmol/l an. Die vollständige Bindung der CK - Isoenzyme an die Ig G - Fraktion (RUD) zeigen die folgenden Abbildungen. Nach Ig G - Zusatz wurden die Isoenzyme quantitativ in ihre Makroform überführt.

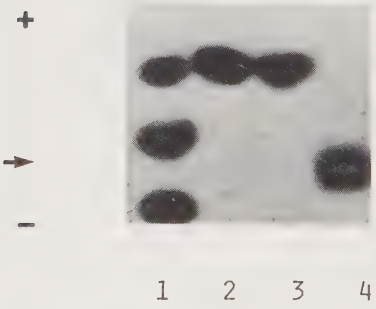
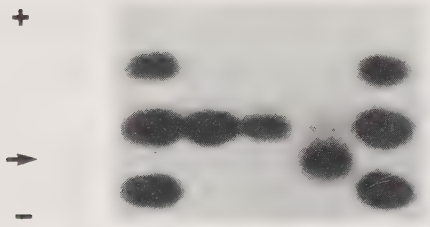


Abb. 17 Elektrophoretische Kontrolle isolierter CK - BB, Überprüfung der in vitro hergestellten Makro - CK - BB (Präparation für die kinetischen Untersuchungen), 2 h bei 4 V/cm, pH 7.

1	Standard (Sigma)	8 µl
2	CK - BB (Uterus)	15 µl
3	CK - BB + Rinderalbumin	17 µl
4	CK - BB + Ig G (RUD)	17 µl



1 2 3 4 5

Abb. 18 Elektrophoretische Kontrolle isolierter CK - MB, Überprüfung der in vitro hergestellten Makro - CK - MB (Präparation für die kinetischen Untersuchungen), 2 h bei 4 V/cm, pH 7.

1	Standard (Sigma)	10 µl
2	CK - MB (Herz)	10 µl
3	CK - MB + Rinderalbumin	15 µl
4	CK - MB + Ig G (RUD)	15 µl
5	Standard (Sigma)	10 µl

3.5. KINETISCHE PARAMETER NATIVER MAKRO - CK SEREN

Zum Vergleich zu der in vitro hergestellten Makro - CK - BB und Makro - CK - MB wurden die nativen Makro - CK - Seren RUD und NAU untersucht.

Für die native Makro - CK - RUD wurde ein K_M - Wert von 1,60 mmol/l mit einer Gesamt - CK - Aktivität von 297 U/l berechnet. Auffallend war hierbei der um 13% höhere K_M - Wert im Vergleich zu der in vitro erzeugten Makro - CK - BB.

Für ein weiteres Makro - CK - haltiges Serum NAU fand sich gegenüber Makro - CK - RUD ein K_M - Wert von 1,87 mmol/l bei einer Gesamtaktivität von 334 U/l.

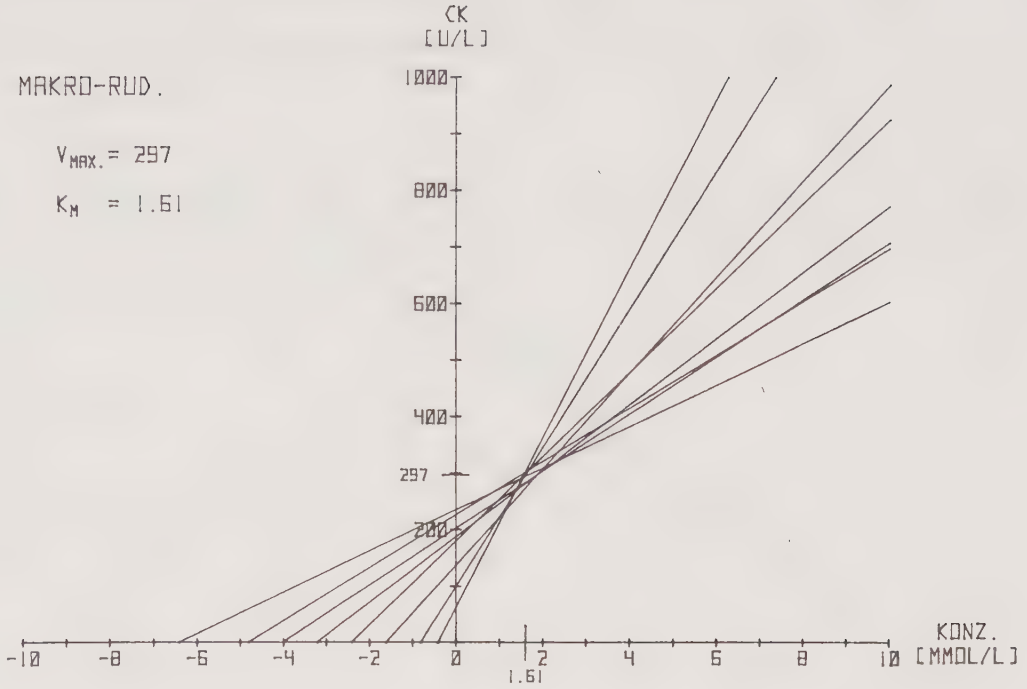


Abb. 19 K_M und V_{max} von nativer Makro - CK - RUD. Auswertung nach CORNISH - BOWDEN, Bestimmung der CK - Aktivität bei 30°C, 40 mmol/l Mercaptoäthanol

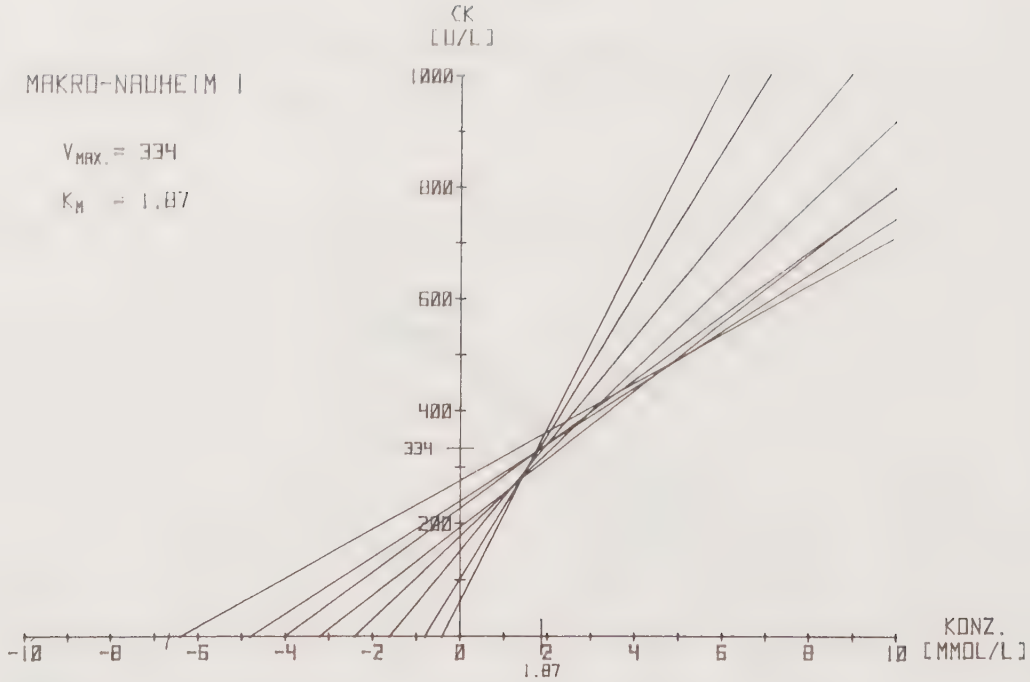


Abb. 20 K_M und V_{max} von nativer Makro - CK - NAU. Auswertung nach CORNISH - BOWDEN, Bestimmung der CK - Aktivität bei 30 °C, 40 mmol/l Mercaptoäthanol

	K_M	Signifikanzniveau 0,05	V_{max}	Signifikanzniveau 0,05
CK - MM + Serum	2,25	2,09 - 2,46	982	950 - 1016
CK - BB + Rinder-albumin	1,04	0,91 - 1,23	353	334 - 367
CK - MB + Rinder-albumin	1,47	1,28 - 1,88	489	475 - 507
CK - BB + Ig G RUD.	1,41	1,25 - 1,88	252	236 - 273
CK - MB + Ig G RUD.	1,50	1,42 - 1,68	455	442 - 468
Makro - CK - RUD.	1,61	1,40 - 1,90	297	268 - 306
Makro - CK - NAU.	1,87	1,52 - 2,65	334	293 - 381

Tab.2 Darstellung der K_M(mmol/l) und V_{max}(U/l) - werte der Isoenzyme, der in vitro Makro-CK und der nativen Makro - CK - Seren.

3.6. BESTIMMUNG DES ISOELEKTRISCHEN PUNKTES

Zur weiteren Charakterisierung der Makro - CK - Komplexe wurden ihre isoelektrischen Punkte (IP) bestimmt. Höhere Ionen- und Proteinkonzentrationen stören die isoelektrische Focussierung und mussten daher vermieden werden. Andererseits darf eine NaCl - konzentration (albuminfrei) von 50 mmol/l nicht unterschritten werden.

3.6.1. IP der CK - MM

Im Ampholytbereich von pH 3,5 bis pH 9,5 stellte sich die CK - MM in mindestens fünf Banden dar, deren isoelektrische Punkte zwischen pH 7,8 und pH 6,4 lagen. Unterschiede zwischen CK - MM aus Skelettmuskel und Herzmuskel zeigten sich dabei nicht.

Bessere Trennergebnisse der CK - MM konnten durch einen Ampholyt - Träger von pH 5,5 bis pH 8,5 erreicht werden. Hierbei erhielt man für die CK - MM sechs Bande mit den isoelektrischen Punkten bei pH 7,3 , 7,0 , 6,8 , 6,5 , 6,4 und 6,2.

In beiden Focussierungsbereichen war der grösste Anteil der CK - Aktivität in der Fraktion mit dem IP von pH 7,0 zu finden.

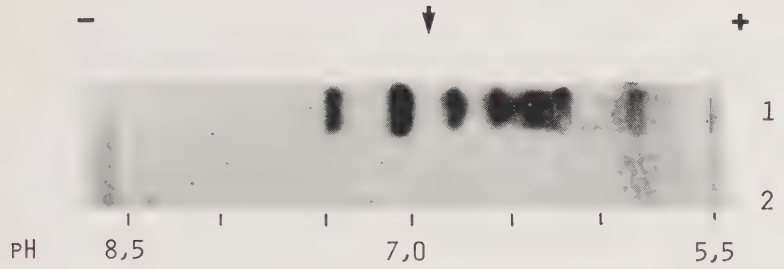


Abb.21 Isoelektrische Punkte der CK - MM (PAG - Plate, pH 5,5 bis 8,5; Trennbedingungen: 2,5 h, 1600 V bei 30 W)

1 Serum - CK - MM Pat. SCH. (Myolyse)

2 Normalserum Pat. SAU.

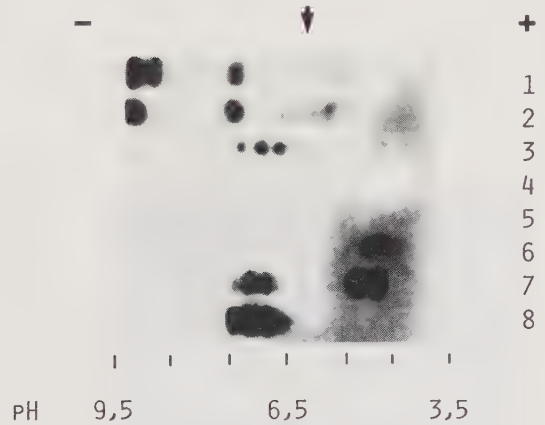


Abb.22 Isoelektrische Punkte der CK - Isoenzyme und Adenylatkinase (PAG - Plate, pH 3,5 bis 9,5; Trennbedingungen: 1,5 h, 1500 V bei 30 W)

1 Adenylatkinase

2 Adenylatkinase

3 Serum - CK - MM Pat. SCH. (Myolyse)

4 Normalserum Pat. SAU.

5 ^{125}I - markierte CK - BB

6 CK - BB - Isoenzym

7 CK - MB - Isoenzym

8 CK - MM - Isoenzym

In Abb. 22 war die eingesetzte CK - MB mit CK - MM verunreinigt. Spur 1 und 2 enthielten ausser Adenylat - Kinase (pH 9,2) auch Hämoglobin (pH 7,5).

3.6.2. IP der CK - MB

Die isoelektrischen Punkte der CK - Isoenzyme MB und BB liegen im erheblich sauren Bereich (Abb.22).
Die Aktivitätsbanden der CK - MB wurden bei pH 4,8 und pH 5,2 gefunden. Um eine Dissoziation der CK - MB während der isoelektrischen Focussierung auszuschliessen und um eine genauere Identifizierung der Aktivitätsbanden zu ermöglichen, wurde der Ampholytträger nach der Focussierung zerschnitten. Anschliessend wurde die Enzymaktivität mit der doppelten Menge Puffer I extrahiert, das Gemisch zentrifugiert (30 min bei 15000 g) und der Überstand auf 3 ml eingeengt. Der jeweilige Überstand der Gelstreifen I bis IV wurde mit einer Agarosegel - Elektrophorese aufgetrennt.

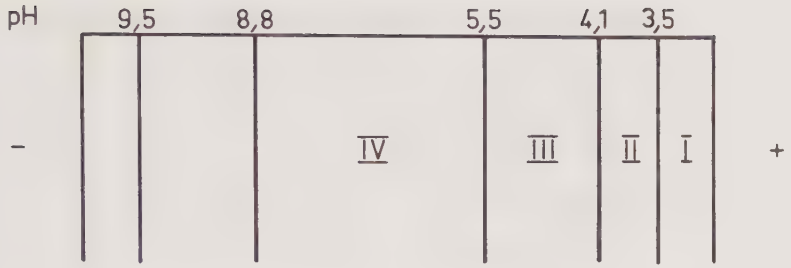


Abb.23 Zerschneidung des Ampholytträgers nach der Focussierung

Gesamt - CK - Aktivität in den zerschnittenen Gelstreifen (Messung im Überstand)

Gelstreifen I 0 U/l Gesamt - CK - Aktivität

Gelstreifen II 0 U/l Gesamt - CK - Aktivität

Gelstreifen III 28 U/l Gesamt - CK - Aktivität

Gelstreifen IV 4 U/l Gesamt - CK - Aktivität

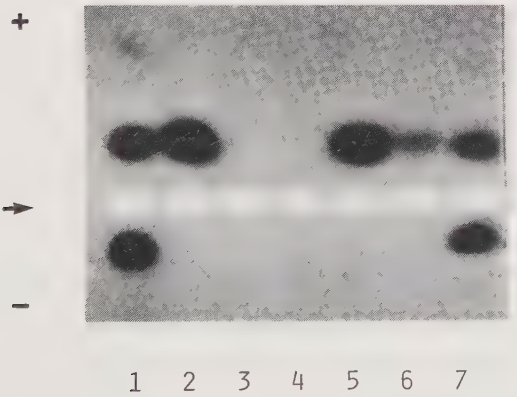


Abb.24 Agarosegel - Elektrophorese der Überstände (Gelstreifen I bis IV), jeweils 15 µl, Standard 5 µl,

CK - MB 8 µl, Trennzeit : 2 h bei 4V/cm Gel.

1 Standard

2 eingesetzte CK - MB

3 Überstand I

4 Überstand II

5 Überstand III

6 Überstand IV

7 Standard

Die eingesetzte CK - MB (Abb.24, Spur 2) war rein. Im Überstand III und IV war nur CK - MB nachzuweisen. Eine Verunreinigung oder eine Hybridisierung und damit die Bildung von CK - MM fand nicht statt. Folglich sind die Aktivitätsbanden in der isoelektrischen Focussierung nur der CK - MB zuzuordnen. Die CK - BB - Aktivitätsbande des eingesetzten Standards erwies sich als sehr schwach.

3.6.3. IP der CK - BB

Ein im Vergleich zur CK - MB ähnliches Verhalten zeigte die CK - BB. Ihre isoelektrischen Punkte, in mehreren Versuchen reproduziert, erwiesen sich als wesentlich unschärfer und lagen im Bereich zwischen pH 4,6 und pH 5,1.
In der relativ breiten CK - Aktivitätsbande konnten Untergruppen nicht sicher dargestellt werden.

Da bei pH - Werten unter 5 CK - BB rasch inaktiviert wird und somit die spezifische CK - Anfärbung ungenaue Ergebnisse liefert, wurde ^{125}I - markierte CK - BB benutzt.
Nach Durchführung der isoelektrischen Focussierung wurde die PAG - Plate (pH 3,5 bis pH 9,5) in ein cm breite Streifen zerlegt und deren Radioaktivität bestimmt.

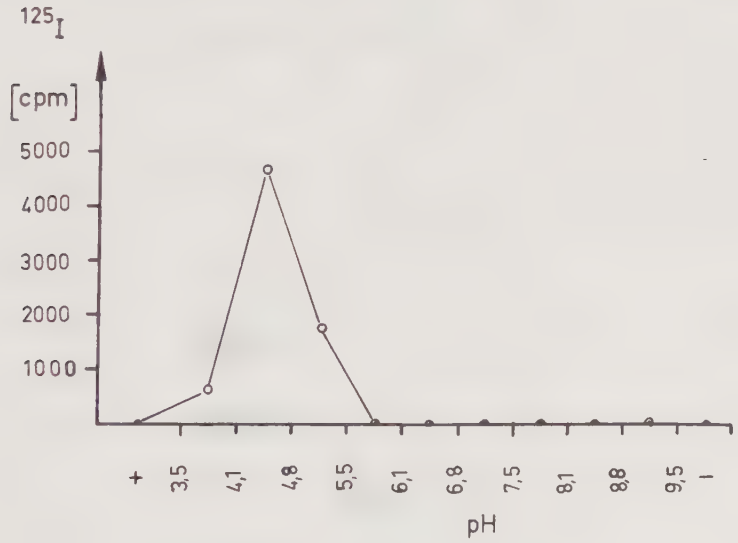


Abb. 25 Verteilung der ^{125}I - markierten CK - BB in der isoelektrischen Focussierung

Das Maximum der Radioaktivität ^{125}I - markierter CK - BB war in den Gelstreifen 1 bis 3 zu finden, was einem pH - Bereich von 4,2 bis 4,8 entspricht. Diese Werte entsprechen den isoelektrischen Punkten, die durch direkte CK - Anfärbung gefunden wurden.

3.6.4. IP der Makro - CK

Die enzymatische Anfärbung salzarmer Makro - CK - Seren nach isoelektrischer Focussierung erbrachte u.a. wegen zu hoher Konzentration an Proteinen nicht die erhofften Ergebnisse. Andrerseits scheiterte der Nachweis von zusätzlich beladener Makro - CK, bestehend aus nativer Makro - CK, die mit ^{125}I - markierter CK - BB beladen war. Der gebildete Komplex blieb unterhalb der Nachweisgrenze in der Autoradiographie. Daher wurden in vitro Makro - CK - Komplexe aus gereinigtem Ig G (RUD.) und aus durch Pepsin - Spaltung gewonnenen $F(ab')_2$ - Fragmenten mit CK - BB gebildet.

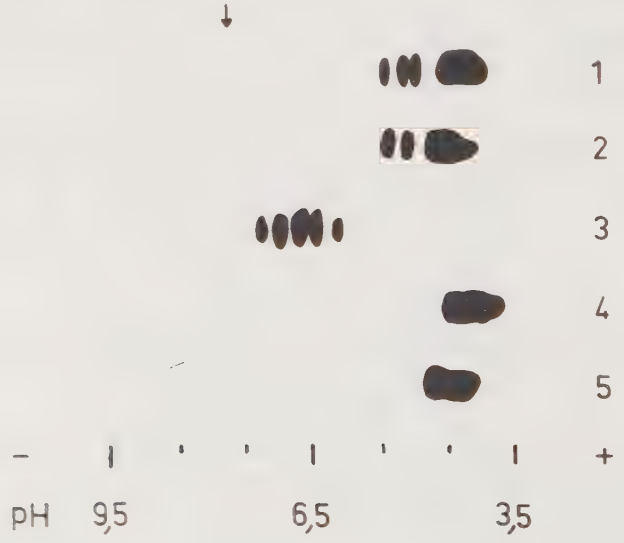


Abb.26 Schematische Verteilung von CK - Aktivitäten der in vitro gebildeten Makro - CK - Formen, bestehend

aus Ig G oder $F(ab')_2$ - Fragmenten mit isolierten Isoenzymen nach isoelektrischer Focussierung (PAG - Plate, pH 3,5 bis pH 9,5 ;Trennzeit: 110 min bei 1500 V und 30 W)

1 $F(ab')_2$ - Fragmente (RUD.) + CK - BB + ^{125}I - CK - BB

2 $F(ab')_2$ - Fragmente (RUD.) + CK - MB

3 $F(ab')_2$ - Fragmente (RUD.) + CK - MM

4 CK - BB + ^{125}I - CK - BB

5 CK - MB

Die Inkubation CK - BB + $F(ab')_2$ bildete eine sehr schwache Doppelbande im pH - Bereich 5,0 bis 5,5; eine Stelle an der sonst keine CK - Isoenzyme zu finden waren.
CK - MB + $F(ab')_2$ ergab ein ähnliches Bild, wobei die Doppelbande (pH 5,2 bis 5,7) leicht kathodenwärts verschoben war. Die Antikörperinkubationen zeigten eine deutliche Makrobildung; der isoelektrische Punkt für Makro - CK - BB hatte sein Maximum bei pH 5,8 , der für Makro - CK - MB sein Maximum bei pH 5,9. Erwartungsgemäss konnte den CK - MM - Ansätzen keine Makrobande zugeordnet werden.

Makro - CK - Formen	IP (pH - Werte)
Makro - CK - BB	pH 5,8
Makro - CK - MB	pH 5,9
CK - BB - $F(ab')_2$	pH 5,0 - 5,5
CK - MB - $F(ab')_2$	pH 5,2 - 5,7

Tab.3 Isoelektrische Punkte der verschiedenen Makro - CK - Formen

nach einer isoelektrischen Focussierung auf Polyacrylamidgel (PAG - Plate, pH 3,5 bis 9,5)

Als Kontrolle der Ansätze wurde eine Agarosegel - Elektrophorese angefertigt.

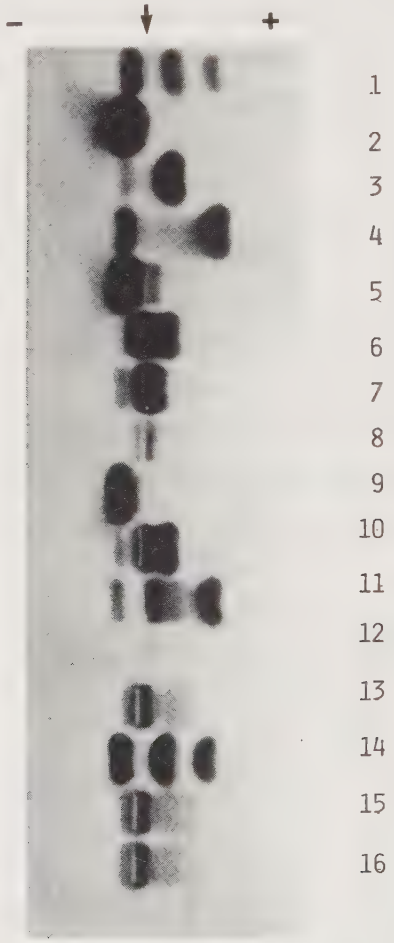


Abb.27 Agarosegel - Elektrophorese der in vitro gebildeten

Makro - CK - Formen, bestehend aus Ig G oder $F(ab')_2$ - Fragmenten mit isolierten Isoenzymen (Trennzeit: 2 h bei 4 V/cm).

1	Standard	7 µl
2	CK - MM	10 µl
3	CK - MB	10 µl
4	CK - BB + ^{125}I - CK - BB	10 µl
5	CK - MM + Ig G (RUD.)	10 µl
6	CK - MB + Ig G (RUD.)	10 µl
7	CK - BB + Ig G (RUD.)	10 µl
8	^{125}I - CK - BB + Ig G (RUD.)	10 µl
9	CK - MM + $F(ab')_2$	10 µl
10	CK - MB + $F(ab')_2$	10 µl
11	CK - BB + CK - BB^x + $F(ab')_2$	10 µl
12	^{125}I - CK - BB + $F(ab')_2$	10 µl
13	Serum (RUD.) + ^{125}I - CK - BB	10 µl
14	Standard	7 µl
15	Serum (RUD.) + ^{125}I - CK - BB	10 µl
16	Serum (RUD.) + ^{125}I - CK - BB	10 µl

Die Agarosegel - Elektrophorese weist nach, dass CK - MM isoenzymrein war. CK - MB und CK - BB waren in diesem Versuch mit CK - MM verunreinigt. Bei der leichten Anschwärzung in Spur 8 handelt es sich um die geringer aktive Form des markierten Makro - CK - BB^x - Komplexes. Makro - CK - Komplexe bildeten sich erwartungsgemäss in den Ansätzen Ig G und CK - MB, stärker ausgeprägt bei Ig G und CK - BB.

Die Ansätze mit $F(ab')_2$ und CK - MB oder CK - BB ergaben ebenfalls einen Makro - CK - Komplex, der jedoch weiter zur Anode gewandert war.

In keinem Fall entstand mit CK - MM ein Makro - CK - Komplex.

4. DISKUSSION

Zur besseren Untersuchung des Makro - CK - Komplexes wurden seine Teilkomponenten, Makro - CK bildende Ig G und menschliche CK - Isoenzyme, isoliert.

4.1. ISOLIERUNG DER CK - ISOENZYME AUS MENSCHLICHEM GEWEBE

Da der Aufschluss der Gewebsproben durch einen Dispersionsrührer zu einer Erwärmung des Homogenisats führte und damit eine Denaturierung der CK - Isoenzyme begünstigte, bedeutete die zweistufige Homogenisation (Grobaufschluss im Dispersionshacker, Feinaufschluss mit Teflonstempelhomogenisator) einen wesentlichen Fortschritt.
Entscheidend für die Enzymausbeute waren Alter und autolytische Veränderung des Autopsiematerials (Herzgewebe), wobei die CK - MB durch ihre im Vergleich zur CK - MM geringere Stabilität zuerst abnahm. Die aus Operationsgut gewonnenen Isoenzyme, CK - MM und CK - BB, konnten daher einfacher und mit höheren Aktivitäten extrahiert werden.
Weiterhin wurde die Präparation durch die , wenn auch unter-

schiedliche Labilität der CK - Isoenzyme erschwert (MORIN, 1977; SZASZ [b] et al., 1978), was eine rasche und dennoch schonende Aufarbeitung erforderte. Deshalb wurde auf die von KEUTEL et al. (1972) vorgeschlagene Methode der"kristallinen Enzymdarstellung"verzichtet, da sie bei einem zu hohen Einsatz an Humangewebe einen Reinheitsgrad erbracht hätte, der für unsere Untersuchungen nicht nötig war.

Die angewandte Isolierung der CK - Isoenzyme mittels Ausschluss- und anschliessender Anionenaustauschchromatographie in Stufengradienten war zufriedenstellend. Dabei diente die vorgeschaltete Ausschlusschromatographie der Eliminierung von Fremdproteinen; die eigentliche Isolierung erfolgte durch den Anionenaustauscher (MERCER, 1974 ; KLEIN et al., 1977; LIESE et al., 1979). Eine weitere methodische Verbesserung stellte die Isoenzymreinigung im linearen NaCl - gradienten dar (LEROUX et al., 1977; TAKAHASHI et al., 1972), bei der eine vollständige Trennung der Isoenzymfraktionen erreicht wurde. Teilweise ergab die CK - MB - Bestimmung in Herzhomogenisaten durch den CK - MB - Inhibitionstest (Merck) hohe CK - MB - Aktivitäten, die sich aber säulenchromatographisch nicht bestätigen liessen. Dieser Effekt war auch nach starker Verdünnung der Gesamt - CK - Aktivität nachweisbar.

Eine Interferenz des Immuninhibitionstests durch grosse Mengen inaktivierter CK - MB (MORIN, 1977) scheint eher unwahrscheinlich, da dieser Effekt auch nach starker Verdünnung persistierte. Viel eher könnte es sich um die h II - CK miochondrialen Ursprungs handeln (MARCHISIO et al., 1979). Dieses Isoenzym (Molekulargewicht: 120000 D) wird im CK - MB -

Hemmtest nicht erfasst und täuscht daher hohe CK - MB - Werte vor.

Die Inaktivierung des Enzyms wurde durch permanente Kühlung, Lichtabschluss und möglichst schnelle Verarbeitung reduziert. Eine weitere Stabilisierung konnte ebenso wie bei SZASZ [b] et al. (1978) durch Zusatz von Albumin (4 gr/100 ml) erreicht werden. Trotz dieser Massnahmen tolerierten die Enzyme das Einfrieren nicht; Verluste von 50 - 80% waren die Regel. Bemerkenswert war jedoch, dass sich die CK - Aktivität nach Auftauen in Kühlraumtemperatur innerhalb von 5 bis 20 h teilweise regenerierte. Die enymatische Stabilität der Isoenzyme ist bei gleichen Lagerungsbedinungen sehr unterschiedlich. In Übereinstimmung mit SZASZ [b] et al.(1978) nahm die Empfindlichkeit der Isoenzyme von CK - MM, CK - MB nach CK - BB zu, im Gegensatz zu Untersuchungen von TSUNG (1976). BAYER et al.(1977) geben die Halbwertszeiten für CK - MM mit 13,5 ± 2 h, für CK - MB mit 6,5 ± 2 h im Serum an.

Nach Untersuchungen von NEALON et al.(1980) hat der pH - Wert einen entscheidenden Einfluss auf die CK - Stabilität, da die CK - Isoenzyme ein sehr schmales pH - Optimum besitzen.

In Abhängigkeit von der Lagerzeit konnte eine "Dehybridisierung" der CK - MB festgestellt werden, da sich in elektrophoretischen Kontrollen zusätzlich zur CK - MB CK - MM fand.

Die dabei entstehende CK - BB würde dann durch ihre hohe thermische Labilität beständig aus dem Gleichgewicht gezogen; nachweisbar wäre demnach neben der CK - MB nur CK - MM. Hierfür spricht, dass dieser Vorgang durch eine Eiweissmatrix verlangsamt werden kann.

4.2. BEEINFLUSSUNG DER KINETISCHEN PARAMETER DER G - GLOBULIN-NER CK - ISOENZYME

Übereinstimmend mit den Ergebnissen von MORIN (1976) wurde ein zunehmender K_M - Wert der CK - Isoenzyme (Kreatin - Phosphat als Substrat) in der Reihenfolge CK - BB (1,04 mmol/l), CK - MB (1,47 mmol/l) und CK - MM (1,25 mmol/l) gefunden. Die Absolutwerte hierfür lagen bei MORIN allerdings über den von uns angegebenen Konzentrationen (CK - BB: 1,2 mmol/l, CK - MB: 3,5 mmol/l, CK - MM: 4,7 mmol/l). Der direkte Vergleich wird durch den bei MORIN niedrigeren ADP - Gehalt im Reaktionsgemisch (0,2 mmol/l) erschwert. Demgegenüber gaben STASI & et al. (1978) für CK - BB (0,71 mmol/l) und CK - MB (1,16 mmol/l) niedrigere Werte an. Besonders fallen hier die unterschiedlichen K_M - Werte von Serum - CK - MM (1,25 mmol/l) und der aus Gewebe isolierten CK - MM (3,03 mmol/l) auf. Dies bedeutet, dass das Enzym, nach Zelluntergang ins Blut übergetreten, trotzdem affiner wäre als bei der direkten Isolierung aus dem Gewebe. Dies erscheint jedoch wenig wahrscheinlich.

Durch die Komplexbildung mit Ig G (Makro - CK - BB) wird die katalytische Aktivität von CK inhibiert. Mit steigenden Ig G - Konzentrationen (RUD.) wurde eine deutliche Aktivitätsminderung gefunden. Der signifikante Aktivitätsrückgang betrug für die CK - BB 28% und für die CK - MB 7% nach Umwandlung in ihre jeweiligen Makro - Komplexe. Darüber hinaus konnte eine Zunahme der K_M - Werte durch die

Ig G - Bindung und damit ein Affinitätsverlust beider Enzyme nachgewiesen werden, der allerdings nur für CK - BB signifikant war (Anstieg von 1,04 auf 1,40 mmol/l). Die Umwandlung von CK - BB in Makro - CK - BB führt folglich sowohl zu einer AFFINITÄTSABNAHME als auch zu einem AKTIVITÄTSVERLUST. Diese kinetische Veränderung könnte als eine nicht kompetitive Hemmung angesehen werden, wobei das Enzym bzw. der Enzym - Substrat - Komplex an einer funktionellen Gruppe ausserhalb des aktiven Zentrums inhibiert wird (LEHNINGER, 1975). Das Immunglobulin wirkt demnach als Inhibitor. Eine naheliegende Erklärung ist die sterische Beeinträchtigung des Enzyms durch die Komplexbildung mit dem Immunglobulin. In dieser Richtung könnte man auch die Veränderungen im doppelt - linearen Diagramm nach CORNISH - BOWDEN interpretieren.
Ausschlusschromatographische Untersuchungen (CHEMNITZ et al., 1979; STEIN [c] et al., 1979; YUU [a] et al., 1978), die für den Makro - CK - Komplex ein Molekulargewicht zwischen 240000 D und 350000 D angeben, lassen eine 1 : 1 oder 1 : 2 Bindung (Ig G 160000 zu Enzym 80000) vermuten.
Bei beiden stöchiometrischen Zusammensetzungen wäre unter der Annahme einer vollständigen Hemmung der gebundenen "B" - Untereinheiten ein Aktivitätsabfall von mindestens 50% zu erwarten gewesen, unabhängig davon ob es sich um Makro - CK - BB oder um Makro - CK - MB handelt. Aufgrund unserer enzymkinetischen Untersuchungen kann nur eine partielle Hemmung der gebundenen Untereinheiten vorliegen, da die Aktivität nach Umwandlung in die Makro - Komplex - Form nur auf 72% für die CK - BB und auf 93% für die CK - MB abfällt.

Da es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um monoklonale, gegen eine Determinante der B - Kette gerichtete, Ig G handelt, müssen sowohl bei CK - BB als auch bei CK - MB identische Bindungsorte vorliegen. Unter dieser Voraussetzung bedeuten die schwächeren enzymkinetischen Veränderungen bei der Makro - CK - MB - Bildung eine geringere Affektion des Enzyms. Damit muss die M - Kette der CK - MB die Auswirkungen der Ig G - Bindung auf die "B" - Untereinheiten mindern, also gewissermassen "protektieren".
Untersuchungen von CHEMNITZ et al. (1979) weisen für Makro - CK eine Michaelis - Konstante von 2,44 mmol/l bei 30°C auf, eine über unseren Ergebnissen liegende Konzentration. Die Unterschiede zwischen in vitro rekombinierter Makro - CK - BB und nativer Makro - CK wurden auf die im Patientenserum vorhandene CK - MM zurückgeführt. Der hohe K_M - Wert von 2,25 mmol/l verschiebt die gemeinsame Michaelis - Konstante aus Makro - CK - BB und CK - MM nach oben.

4.3. BESTIMMUNG DES IP VON CK - ISOENZYMEN UND MAKRO - CK - KOMPLEXEN

Der Nachweis der CK - Isoenzyme über ihre spezifische enzymatische Aktivität wurde notwendig, da die Beurteilung von nur proteingefärbten Polyacrylamid - Platten wegen einer Vielzahl

an Proteinbanden zu unspezifisch war. Andrerseits war eine kristalline Darstellung der Enzyme wegen der begrenzten Ausgangsmenge an Humangewebe und Makro - CK - Seren kaum möglich. Ein Vorteil der Enzymfärbung war, dass nach der Focussierung nur intakte CK - Isoenzyme zur Darstellung gelangten.

4.3.1. IP der CK - MM

THORSTENSSON et al. (1975) fanden im focussierten Dichtegradienten zwei Aktivitätsbanden im pH - Bereich 6 bis 7, die sie der CK - MM und der CK - MB zuordneten.
Mit einer ähnlichen Methode beschrieben WEVERS et al. (1977) drei isoelektrische Punkte für CK - MM, sowie eine weitere ihm nicht erklärbare X - Bande bei pH 6,07. Aus Hybridisierungsversuchen schloss WEVERS auf die Existenz zweier M - Ketten "M_a und M_b", die durch Kombination drei Subisoenzyme ergäben (M_aM_a, M_bM_a, M_bM_b).
Unsere Untersuchungen bestätigten dies nicht, da bei der CK - MM 5 bis 6 isoelektrische Punkte nachgewiesen werden konnten, was die Existenz von mindestens drei verschiedenen M - Ketten erfordern würde.

4.3.2. IP der CK - MB

Die CK - MB hatte in unseren Versuchen zwei isoelektrische Punkte: bei pH 4,6 und pH 4,8. Andere Autoren (WEVERS et al., 1977) geben einen IP von pH 5,2 an.
Die Interpretation bereitete anfänglich Schwierigkeiten, da die IP's von CK - MB und CK - BB sehr nahe beieinander lagen und eine Dissoziation der CK - MB in ihre Untereinheiten während der Focussierung nicht ausgeschlossen werden konnte. Hierfür sprach auch, dass häufig MM - Banden nachzuweisen waren. In Versuchen konnte jedoch die CK - MB im fraglichen pH - Bereich (pH 4,1 - 5,5) aus dem Polyacrylamidgel extrahiert und eindeutig als CK - MB identifiziert werden.

4.3.3. IP der CK - BB

Die Darstellung des IP von CK - BB über ihre katalytische Aktivität war angesichts des von uns gefundenen pH von 4,6 bis 5,1 schwierig und musste, da in diesem Bereich die CK - BB in einem hohen Prozentsatz (BOHNER et al., 1981) inaktiviert ist, durch sehr hohe CK - Aktivitäten erreicht werden.
JOCKERS - WRETOU et al. gaben 1979 für CK - BB einen IP von pH 4,5 an, ein Wert, der sich etwa mit unseren Ergebnissen deckt. Obwohl der IP gut zu reproduzieren war, liess er sich nicht scharf focussieren. Dies könnte, ausser durch Diffusion,

durch eine zunehmende Säuredenaturierung erklärt werden.
Um die enzymatische Anfärbung der CK umgehen zu können, wurde der Versuch unternommen, den Nachweis durch Verwendung gereinigter, radioaktiv markierter CK - BB zu erbringen.
Auch hier findet sich die markierte CK - BB in einem relativ breiten Gelabschnitt (pH 3,5 - 5,5). Die maximale Aktivität (pH 4,1 - 4,8) deckt sich mit unseren oben beschriebenen Befunden. Dies bedeutet, die CK - BB bildet, wie oben vermutet, Banden weit im sauren Bereich, die über ihre CK - Aktivität nicht mehr nachweisbar sind.

4.3.4. IP der Makro - CK - Formen

Die von uns gefundenen isoelektrischen Punkte von pH 5,8 für Ig G - CK - BB und pH 5,9 für Ig G - CK - MB lagen in dem von JOCKERS - WRETOU et al.(1979) vermuteten Bereich zwischen pH 5,6 und 6,8.
Der geringe Unterschied des IP beider Makro - CK - Formen ist durch die höhere negative Überschussladung der CK - BB und der daraus resultierenden stärkeren Wanderung in der isoelektrischen Focussierung zur Anode begründet.
Analog hierzu lag der IP der aus $F(ab')_2$ und CK - Isoenzymen gebildeten Makro - CK - Komplexe noch weiter in Richtung zur Anode. Auch hier konnte ein geringer Unterschied im isoelektrischen Punkt zwischen $F(ab')_2$ - CK - BB-(pH 5,0) und

$F(ab')_2$ - CK - MB - Komplexen (pH 5,2 - 5,7) nachgewiesen werden. Interferenzreaktionen durch Adenylat - Kinase konnten von uns ebenfalls ausgeschlossen werden, nachdem ihr IP bei pH 9,5 und 9,2 weit im alkalischen bestimmt worden war.
KJELLIN et al. (1974) und LAURENZI et al. (1978) gaben für γ - Globuline isoelektrische Punkte im alkalischen Bereich an. Daraus folgt, dass während der isoelektrischen Focussierung starke, dissoziierende Kräfte auf die Makro - CK - Komplexe wirken, da der IP der γ - Globuline im alkalischen Bereich, der IP der CK - Isoenzyme jedoch im sauren Bereich lokalisiert ist. Da den Makro - CK - Komplexen dennoch isoelektrische Punkte zugeordnet werden können, ist eine relativ starke, d.h. spezifische Bindung zwischen Ig G und dem Enzym anzunehmen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1) Die Isoenzyme der Kreatin - Kinase isolierten wir durch säulenchromatographische Trennung aus humanem Gewebe (CK - BB aus Uterus, CK - MB aus Myokard und CK - MM aus Skelettmuskel).

2) Zur analytischen Darstellung der Isoenzyme und der Makro - CK - Komplexe wählten wir die elektrophoretische Trennung in Agarosegel mit nachfolgender enzymatischer Anfärbung (Tetrazoliumblau).

3) Den zweiten Komplexpartner, CK - BB - bindende Immunglobuline der Klasse G, isolierten wir nach acidolytischer Spaltung der Komplexe aus Makro - CK - Ämie - Seren. Hierzu verwendeten wir zwei unterschiedliche Verfahren: eine ausschlusschromatographische Trennung, sowie eine hochspezifische Affinitätschromatographie an Staphylokokken - Protein A.

4) Unsere Untersuchungen zeigen , dass die Bindung zwischen CK - BB und Ig G reversibel ist.
Aus Makro - CK - Ämie - Seren isoliertes Immunglobulin G und homologe CK - BB bilden in vitro ebenfalls Makro - CK - Komplexe, die identisch sind mit den in vivo existenten Formen.

5) Weiterhin konnten wir erstmals eine Bindung von CK - MB durch CK - bindendes Immunglobulin G nachweisen. Dieser Komplex

zeigte ebenfalls typische Eigenschaften der Makro - CK. Die Bindungsaffinität der Ig G - Moleküle war für CK - MB allerdings wesentlich geringer. Die M - Untereinheit der CK - MB stört folglich die Immunglobulinbindung dieses Enzyms. Eine Bindung von CK - MM an Ig G wurde in keinem Fall nachgewiesen.

6) Wie wir in immunologischen und elektrophoretischen Versuchen zeigten, wird CK - BB an das $F(ab')_2$ - Fragment (Pepsinspaltung), sowie an den Fab - Teil (Papainspaltung) gebunden, in keinem Fall jedoch an den Fc - Teil des CK - bindenden Immunglobulins.

7) Das Immunglobulin G wirkt bei der Umwandlung der CK - BB in die Makroform als nicht - kompetitiver Inhibitor. Dies macht sich bei der CK - BB in einer Abnahme von V_{max} und einer Zunahme der Michaelis - Konstante K_M bemerkbar.
Die Makro - CK - MB - Form zeigt eine entsprechende, allerdings weniger ausgeprägte Veränderung ihrer kinetischen Eigenschaften.

8) Bei der Bestimmung der isoelektrischen Punkte (Isofocussierung) zeigte die CK - MM mindestens 6 Subbanden (pH 7,3 , 7,0 , 6,8 , 6,5 , 6,4 , 6,2), die CK - MB eindeutig 2 Subbanden (pH 4,8 . 5,2).
Der isoelektrische Punkt der CK - BB konnte lediglich abgeschätzt werden, da der IP der CK - BB im sauren pH - Bereich von etwa 4,6 bis 5,1 liegt, wo das Enzym rasch inaktiviert bzw. denaturiert wird.
Dagegen konnten wir die isoelektrischen Punkte der Ig G - CK - BB/ - CK - MB in diesem System bei pH 5,8 bzw. 5,9 festlegen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

BAYER, P.M., F. GABL, TH. GERGELY, J. ZAZGORNIK, K. WIDAHLM, O. SKALAK
Isoenzyme der Creatinkinase in der Perinatalperiode.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 15, 349 - 352 (1977)

BLUM [a], H., B. WEBER, B. DEUS, H. UEBERBERG, W. GEROK
Nachweis eines mitochondrialen Isoenzyms der Kreatinkinase im menschlichen Herzmuskel.
Z. Physiol. Chem. 359, 254 - 255 (1978)

BLUM [b], H., B.WEBER, B. DEUS, W. GEROK
Purification and properties of mitochondrial creatine kinase from human heart.
Z. Physiol. Chem. 359, 1058 (1978)

BOHNER, J., W. STEIN, E. KUHLMANN, M. EGGSTEIN
Serum - creatine - kinase BB linked to immunglobulin G.
Clin. Chim. Acta 97, 83 - 88 (1979)

BOHNER, J., W. STEIN, W. RENN, R. STEINHART, M. EGGSTEIN
Stability of macro creatine kinase and creatine kinase isoenzymes compared: heat inactivation test for determination of thermostable creatine kinases.
J. Clin. Chem. Biochem. 19, 1021 - 1026 (1981)

CHEMNITZ, G., E. JOCKERS - WRETOU, E. SCHMIDT, F. W. SCHMIDT, J. LOBERS
Macro - creatine - kinase - BB: observations on six patients.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 17, 725 -729 (1979)

CORNISH - BOWDEN siehe EISENTHAL and CORNISH - BOWDEN

DAWSON, D., H. EPPENBERGER, N. KAPLAN
The comperative enzymology of creatine - kinase.
J. Biol. Chem. 242/2, 210 -217 (1967)

EMPFEHLUNGEN DER DEUTSCHEN GESELLSCHAFT FÜR KLINISCHE CHEMIE
Standard - Methode zur Bestimmung der Aktivität der Kreatin - Kinase.
J. Clin. Chem. Biochem. 15, 249 -254 (1977)

EISENTHAL, R., A. CORNISH - BOWDEN
The direct linear plot.
Biochem.J. 139, 715 - 720 (1974)

GERHARDT, W., L. LJUNGDAHL, J. BÖRJESSON, S. HOFENDAHL, B. HEDENAS
Creatine kinase B subunit activity in human serum I.
Development of an immuninhibition method for routine determination of S - creatine kinase B subunit activity.
Clin. Chim. Acta 78, 29 -41 (1977)

HEUN, P., F. SCHEIDT, D. SOBE, R. KATTERMANN, J. JAKOB
Diagnostische Aussagekraft der Kreatin - Kinase - MB: Verlaufsuntersuchungen bei kardialen und zerebralen

Erkrankungen.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 17, 747 - 755 (1979)

HOFSTEE, B,H.J.
Non - inverted versus inverted plots in enzyme kinetics.
Nature (London) 184, 1296 -1298 (1959)

HOLLANDER,M., A. D. WOLFE
Nonparametric statistical methods.
Verlag John Wiley New York (1973)

JAMES, G., R. HARRISON
Creatine kinase isoenzymes of mitochondrial origin in human serum.
Clin. Chem. 25/6, 943 - 947 (1979)

JOCKERS - WRETOU, E., G. PFLEIDERER
Quantitation of creatine - kinase - isoenzymes in human tissues and sera by an immunological method.
Clin. Chim. Acta 58, 223 - 232 (1975)

JOCKERS - WRETOU, E., E. PLESSING
Atypical serum - creatine - kinase isoenzyme pattern caused by complexing of creatine - kinase BB with immunglobulins G and A.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 17, 731 - 737 (1979)

JUNG, K., R. NEUMANN, G. COBET, E. NUGEL, E. EGGER
Creatine - kinase isoenzyme BB in serum of healthy adults and children.
Clin. Chim. Acta 91, 165 -168 (1979)

KENDALL, M. G.

Rank correlation methods.

4 th. edn. Griffin, London (1970)

KEUTEL, H.J., K. OKABE, H.K. JACOBS, F. ZITER, L. MALAND, S.A. KUBY

Studies on adenosine triphosphate transphosphorylases isolation of the crystalline adenosine triphosphate - creatine - transphosphorylases from the muscle and brain of man, calf and rabbit and a preparation of their enzymatically active hybrids.

Arch. Biochem. Biophys. 150, 648 -678 (1972)

KJELLING, K.G., O. VESTERBERG

Isoelektric focusing of CSF proteins in neurological diseases.

J. Neurol. Sciences 23, 199 - 213 (1974)

KLEIN, B., J. A. FOREMAN, C. JENNELOT, J.E.SHEEHAN

Separation of serum creatine - kinase isoenzymes by ion - exchange column chromatography.

Clin. Chem. 23/3, 504 -510 (1977)

LANG, H., U. WÜRZBURG, D. NEUMEIER, M. KNEDEL , W. PRELLWITZ, R. KATTERMANN, H. SCHLEBUSCH, J. SCHÜRMANN

Creatin Kinase - Isoenzyme: idiopathisches Auftreten von Creatin - Kinase BB - Aktivitäten im Serum von Patienten.

Klin. Wochenschr. 56, 641 - 646 (1978)

LAURENZI, M. A., H. LINK

Localization of the immunglobulins G, A and M. β - trace protein and γ - trace protein on isoeletric focusing of serum and cerebrospinal fluid by immuno-fixation.

Acta Neurol. scandinav. 58, 141 - 147 (1978)

LEHNINGER, A. L.

Biochemistry: the energy - charge of the ATP system. second edn. Worth Publishers Inc. 538 - 539 (1975)

LEROUX, M., H. K. JACOBS, S. W. RABKIN, P. R. DESJARDINS

Measurement of creatine - kinase Z in human sera using a DEAE - cellulose mini - column method.

Clin. Chim. Acta 80, 253 - 264 (1977)

LIESE, W., R. REPPIN, H. URBAHN

Untersuchungen zur säulenchromatographischen Trennung der Isoenzyme der Kreatin - Kinase.

Z. Med. Labor Diagnose 20, 78 - 86 (1979)

LIM, F.

Significance and applications of CPK - isoenzyme subbands in clinical labarotory.

Clin. Chem. 21/7, 975 (1975)

LINEWEAVER, H., D. BURK

The determination of enzyme dissociation constants.

J. American Chem. Soc. 56, 658 - 670 (1934)

LJUNGDAHL, L., W. GERHARDT

Creatine - kinase isoenzyme variants in human serum.

Clin. Chem. 24/5, 832 - 834 (1978)

MARCHÍSIO, M., R. MALVANO, A. MASSAGLIA

Creatine - kinase forms in human skeletal and cardiac muscle.

Clin. Chim. Acta 92, 45 - 52 (1979)

MERCER, D. W.

Separation of tissue and serum creatine - kinase isoenzymes by ion - exchange column chromatography.

Clin. Chem. 20/1, 36 - 40 (1974)

MORIN, L. G.

Improved separation of creatine - kinase cardiac isoenzyme in serum by batch - fractionation.

Clin. Chem. 22/1, 92 - 97 (1976)

MORIN, L. G.

Creatine - kinase: stability, inactivation, reactivation.

Clin. Chem. 23/4, 646 - 652 (1977)

MÜLLER, M.

Makrokreatinkinase: Untersuchungen über die Natur der Kreatinkinase - Immunkomplexe .

Promotion in Vorbereitung

NEALON, D. A., S. M. PETTIT, A. R. HENDERSON

Effect of serum pH on storage stability and reaction lag phase of human creatine - kinase isoenzymes.
Clin. Chem. 26, 1165 - 1169 (1980)

PORTER, W., W. TRAGER

Improved non - parametric statistical methods for the estimation of Michaelis - Menten kinetic parameters by the direct linear plot.
Biochem. J. 161, 293 - 302 (1977)

SAX, S. M., J. J. MOORE, J. L. GIEGEL, M. WELSH

Atypical increase in serum creatine - kinase activity in hospital patients.
Clin. Chem. 22/1, 87 - 91 (1976)

SAX, S. M., J. J. MOORE, J. L. GIEGEL, M. WELSH

Further observations on the incidence and nature of atypical creatine - kinase activity.
Clin. Chem. 25/4, 535 - 541 (1979)

STEIN [a], W., J. BOHNER

Immunglobulin- bound creatine - kinase BB ("Makro - CK") in three patients with different diseases.
Clin. Chem. 25/8, 1513 - 1514 (1979)

STEIN [b], W., J. BOHNER

Makro - Kreatinkinase.
Klin. Wochenschr. 57, 1117 - 1121 (1979)

STEIN [c], W., J. BOHNER, M. EGGSTEIN

Eigenschaften und Bedeutung von Makro - Kreatinkinasen.

J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 17, 739 - 745 (1979)

SZASZ [a], G., W. GRUBER, E. BERNT

Differences in substrat affinity among the isoenzymes.

Clin. Chem. 24/2, 245 - 249 (1978)

SZASZ [b], G., W. GRUBER, E. BERNT

Effect of thiols on isoenzyme activity during storage at various temperatures.

Clin. Chem. 24/9, 1557 - 1563 (1978)

TAKAHASHI, K., S. USHIKUBO, M. OIMOMI, T. SHINKO

Creatine phosphokinase isoenzymes of human heart muscle.

Clin. Chim. Acta 38, 285 - 290 (1972)

THORSTENSSON, A., B. SJÖDING, J. KARLSSON

Progress in isoelectric focusing and isotachophoresis. Separation of isoenzymes of creatine phosphokinase and lactate dehydrogenase in human heart muscle by isoelectric focusing.

Ed: Righetti, P. G. North Holland Publishing Comp.

213 - 222 (1975)

TSUNG, S. H.

Creatine - kinase isoenzyme patterns in human tissue obtained at surgery.

Clin. Chem. 22/2, 173 - 175 (1976)

URDAL, P., S. LANDAAS

Macro - creatine - kinase BB in serum and some data on its prevalence.

Clin. Chem. 25/3, 461 - 465 (1979)

WEVERS, R., R. WOLTERS, J. SOONS

Isoelectric focusing and hybridisation experiments on creatine kinase (EC 2.7.3.2.).

Clin. Chim. Acta 78, 271 - 276 (1977)

YUU, H., Y. TAKAGI, O. SENJU, J. - I. HOSOYA, K. GOMI, T. ISHII

Creatine - kinase isoenzyme of high molecular mass in serum of a cancer patient.

Clin. Chem. 24/11, 2054 - 2057 (1978)

Herrn Prof. Dr. M. Eggstein, ärztlicher Direktor der Abteilung IV der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen, möchte ich für die Stellung des Themas danken.
Bei der Planung, den Versuchen und der Ausarbeitung waren Dr. J. Bohner und Dr. Dr. W. Stein ständige Ratgeber und Kritiker. Ihnen gilt ebenfalls mein herzlichster Dank.

7. LEBENSLAUF

Am 1.Mai 1952 wurde ich als Sohn von Dr. Walter Krais, Gynäkologe, und seiner Ehefrau Dr. Ingrid Krais, Zahnärztin, in Tübingen geboren. Dort besuchte ich die Grundschule und von 1963 an das Kepler - Gymnasium. Nach dem Wohnortwechsel nach Stuttgart legte ich 1971 am Friedrich - Eugen - Gymnasium das Abitur ab.

Im Sommersemester 1972 nahm ich das Studium der Agrarbiologie (Schwerpunkt Zoophysiologie) an der Universität Hohenheim auf; 1977 schloss ich mit Auszeichnung ab.

1977 begann ich mit dem Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm, wo ich 1978 das Physikum ablegte.

Im gleichen Jahr wechselte ich an die Universität Tübingen, an der ich 1979 das 1. Staatsexamen und 1981 das 2. Staatsexamen bestand. Von Oktober 1981 an war ich als Internatsstudent am Katharinenhospital in Stuttgart und legte am 12.Oktober 1982 das 3. Staatsexamen mit Erfolg ab.